

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

**CINtec®PLUS (Ki-67 e p16^{INK4a}) vs Métodos
Biomoleculares
em casos de Lesão Intraepitelial Baixo Grau do colo do
útero**

(Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina e
Oncologia Molecular,
submetida à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto)

Mestranda: Mariana Cruz da Costa

Orientador: Prof. Doutor Rui Medeiros

Co-orientadora: Dra. Conceição Saldanha

Outubro 2013

Agradecimentos

Gostaria de deixar um agradecimento a todos que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho, tão importante para o meu desenvolvimento científico.

Ao Prof. Doutor Rui Medeiros, meu orientador neste trabalho, pela orientação e conhecimentos transmitidos e disponibilidade demonstrada em todo o acompanhamento desta tese.

À Dra. Conceição Saldanha, minha co-orientadora, por toda a dedicação e disponibilidade prestadas, e por todas as recomendações e indispensáveis sugestões.

Ao Prof. Doutor Vicente Gonçalves, por todo o apoio na análise histológica dos casos, e em nome da LAP pela disponibilidade de meios necessários no serviço, para a realização do projecto científico.

Ao Prof. Doutor Franclim Ribeiro e ao Dr. Carlos Catalão a disponibilidade de informação sobre a metodologia apresentada, com total esclarecimento e auxílio bibliográfico.

À Dra. Monika Wolff pelo tempo de formação disponibilizado e por todo o auxílio na avaliação exaustiva de todos os casos. Foi um apoio crucial no entendimento desta metodologia.

Um particular agradecimento aos meus colegas de trabalho por todo o apoio prestado nas mais diversas formas, especialmente ao Dr. Carlos Sousa, pela sua participação na parte técnica deste trabalho que não teria sido conseguida sem a sua colaboração.

Por fim, agradeço ao nosso pequeno grupo de investigação e desenvolvimento, principalmente à Dra. Conceição Saldanha por dirigir esta linha de investigação.

Resumo

O Cancro do Colo do Útero (CCU) é uma das neoplasias mais prevalentes em todo o mundo. Sabe-se que a principal responsável pelo desenvolvimento da sua carcinogénese é a infecção persistente pelo Papilomavirus Humano (HPV).

O CCU tem um longo período de lesões precursoras que antecedem o carcinoma e que permitem a existência de uma janela de detecção e tratamento. Para além da citologia e dos testes de HPV existentes, utiliza-se a imunohistoquímica como teste auxiliar de diagnóstico.

Não existe uma ferramenta útil para gestão dos resultados de citologia LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau) que seja universal para toda a população, pois o teste de HPV tem algumas limitações, por exemplo, em grupos de mulheres muito jovens. Pretende-se com este estudo determinar se a combinação dos marcadores p16^{INK4a} /ki-67 como novo método de diagnóstico de lesões cervicais de baixo grau, poderá contribuir para uma avaliação de risco imediato de CIN2+ num grupo de doentes, evitando a colposcopia imediata nos casos CINtec® PLUS negativos.

O CINtec® PLUS obteve uma elevada especificidade mas falhou quase metade dos casos de CIN2+. Por comparação com outros estudos, eram esperados valores de sensibilidade mais elevados, mas na realidade esta não foi superior a 50%.

Concluindo, a resposta ao grande objectivo deste estudo, é não. Um resultado negativo com CINtec® PLUS não é seguro para excluir uma paciente com LSIL de avaliação por colposcopia. Mas dado o enviesamento desta amostra, aceita-se que este teste possa ter um comportamento diferente quando efectuado em lâminas frescas e com metodologia automatizada. Carece de mais estudo para avaliar se, realmente, pode ter impacto na decisão de exclusão de exame de colposcopia.

Serão necessários estudos em séries mais alargadas para avaliar de uma forma mais aprofundada a hipótese de o CINtec® PLUS ser integrado nos algoritmos de rastreio.

Abstract

Cervical Cancer is one of the most prevalent carcinomas worldwide. It is known that the main trigger in the carcinogenesis is the persistent infection by Human Papillomavirus.

There is a long period of pre-cancerous lesions that precede the carcinoma, and allow early detection, diagnosis and treatment of cervical cancer. Besides cytology and HPV testing, immunocytochemistry has been used as an auxiliary aid in diagnosis.

There is not a useful tool for the management of LSIL results that can be used universally, as there are, for instance, in younger women, limitations in the HPV testing.

With this study it is intended to determine if the CINtec® Plus dual-stain for p16^{INK4a} and Ki-67 as a new method for diagnosing low grade intraepithelial lesions, could contribute for an evaluation of immediate CIN2+ risk, avoiding the immediate colposcopy on negative results.

CINtec® PLUS obtained high specificity, but missed almost half of the CIN2+ cases. Comparing with other studies, higher levels of sensitivity were expected, but the truth is that the percentage was not superior to 50%.

To summarize, the answer to the big goal of this study is no. A negative result with CINtec® PLUS is not safe to exclude a patient with LSIL from colposcopy. But as this sample contained different bias, one can accept that the test may have a different behaviour when performed on fresh slides or even with the upcoming automation. More studies are needed in order to evaluate if there will be an impact on the decision of excluding the colposcopy exam.

Studies with larger sample will be required to analyse more thoroughly the hypothesis of CINtec® PLUS being integrated in the screening algorithms.

Índice

Agradecimentos.....	2
Resumo.....	3
Abstract.....	4
Índice	5
Abreviaturas e símbolos.....	7
Introdução.....	8
CCU.....	11
Perspectiva Histórica.....	11
Epidemiologia.....	12
Factores de risco e transmissão.....	14
Etiopatogenia.....	16
Citopatologia.....	18
Histopatologia	20
Prevenção – rastreio e vacinas	22
HPV	24
Definição – estrutura e organização genómica	24
Classificação do HPV	27
Epidemiologia do HPV	29
Papel do HPV na carcinogénese	30
Métodos moleculares de detecção de HPV	34
Biopatologia do CCU	40
Ciclo celular	42
Regulação do ciclo celular e papel do p16 no ciclo celular	43
Proliferação e ki-67	44
Método para avaliação de desregulação do ciclo celular – CINtec® PLUS.....	45
Objectivos.....	47
Objectivo Geral.....	47
Objectivos Específicos	47
Material e métodos	48

População em estudo	49
Procedimentos laboratoriais – especificações técnicas	51
Citologia – reavaliação	51
CINtec® PLUS.....	51
Avaliação dos imunomarcadores	52
Abbott RealTime HR-HPV	54
cobas® HPV	55
Cervista® HPV 16/18	56
APTIMA® HPV	56
<i>digene</i> ® HC2 HPV DNA.....	58
LINEAR ARRAY® HPV	59
Métodos estatísticos	60
Resultados.....	61
Análise de dados	61
Descrição da base de dados.....	61
Caracterização da população.....	63
Validação estatística dos objectivos de estudo	68
Discussão de Resultados	78
Conclusão.....	83
Referências Bibliográficas	85

Abreviaturas e símbolos

ASCCP - American Society for Colposcopy and Cervical Pathology

ASCUS – Atypical squamous cells of undetermined significance (células escamosas atípicas de significado indeterminado)

ASR – Age standardised rate

CIN - Neoplasia Intraepitelial Cervical

CCU – Cancro do Colo do Útero

CCV – Citologia cérvico-vaginal

CMV – Citomegalovírus

DNA – Deoxirribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

DST – Doença sexualmente transmissível

FDA – Food and drug administration

H0 – Hipótese nula

HC2 – Hybrid capture, *digene*® HC2 HPV DNA (Captura híbrida)

HE - Hematoxilina-Eosina

HIER – heat induced epitope retrieval

HLA - Human leukocyte antigen (antigénio leucocitário humano)

HPV – Human Papillomavirus (Papilomavírus Humano)

HSIL – high-grade squamous intraepithelial lesion (Lesão pavimentosa intraepitelial de alto Grau)

HSV – Herpes simplex virus (herpesvírus simplex)

IARC – Internacional Agency for Research on Cancer

MHC-I - Complexo de Histocompatibilidade I

LCR – long control region (Região Regulatória)

LSIL – low-grade squamous intraepithelial lesion (Lesão pavimentosa intraepitelial de baixo grau)

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – open reading frames (regiões de leitura aberta)

pb – Pares de base

PCR – Polymerase Chain Reaction

p16 – Proteína p16

pRb – Proteína do retinoblastoma

p53 - Proteína supressora tumoral

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA - Ácido Ribonucleico

SPSS - Statistical package for social sciences

μL - microlitro

Introdução

O CCU apesar de ser um dos carcinomas mais estudados e com maior decréscimo de mortalidade e incidência nos últimos anos, é ainda uma das neoplasias mais prevalentes em todo mundo. (Bosch F 2006; Schiffman M 2011)

A sua incidência ao variar com a localização geográfica e a inexistência de programas de rastreio e vacinação nos países em vias de desenvolvimento, faz com que estes apresentem uma taxa de incidência e mortalidade preocupantes. Portugal é um dos países com incidência mais elevada na Europa. (Ferlay J. 2010)

O carcinoma do colo do útero apresenta um longo período de lesões precursoras que antecedem o carcinoma invasor, permitindo a existência de uma janela de detecção e tratamento razoavelmente alargada. (Bosch F 2006; Wentzensen N 2007; Schiffman M 2011)

O rastreio do CCU, utilizando como método de detecção a citologia, contribuiu para um declínio da incidência e mortalidade por CCU nos últimos 50 anos. Existem ainda, no entanto, várias limitações; a citologia não deixa de ser um método de observação morfológica que acarreta sempre uma grande subjectividade inter-observadores. (Bosch F 2006; Wentzensen N 2006; Wentzensen N 2007; Tsoumpou I 2009; Schiffman M 2011)

O aparecimento das técnicas de Biologia Molecular revolucionou o estudo do CCU, confirmando que a infecção por HPV é a principal responsável pelo desenvolvimento da carcinogénese do colo uterino, que se inicia por uma infecção aguda por um ou mais subtipos víricos carcinogénicos de HPV, seguida de persistência da infecção viral (e não *clearance*), lesão pré-maligna e por fim invasão. (Wentzensen N 2006; Wentzensen N 2007; Schiffman M 2011)

A maior parte dos testes de HPV validados fornece apenas a informação de presença ou ausência de vírus, não permitindo diferenciar as infecções transientes das potencialmente transformadoras. (Cuschieri K 2008; Tsoumpou I 2009)

A genotipagem e os novos testes comerciais com genotipagem parcial conferem maior informação de prognóstico. Sabe-se, por exemplo, que o risco absoluto para desenvolvimento de lesões através de infecção por HPV-16 é muitíssimo superior ao de outros subtipos víricos. No entanto, não está ainda estabelecida a importância dos outros HPV de alto risco (resultado nos testes de nova geração) e as infecções múltiplas continuam a ser um acontecimento comum. (Group 2000; Cuschieri K 2008)

Constata-se que a informação obtida pelos testes existentes é insuficiente. Questiona-se a importância de biomarcadores como a presença de sobre-expressão de proteínas celulares (p16^{INK4a} e Ki-67) em células infectadas por HPV, e também a

expressão do RNAm de E6/E7 como marcador de integração viral. (Wentzensen N 2007; Denton K 2010)

A citologia com classificação LSIL representa cerca de 2-3% de todas as citologias e é objecto deste estudo pois uma parte destas mulheres vai ter lesão evolutiva para HSIL (lesão intraepitelial de alto grau). O teste de HR-HPV (HPV de alto risco) não tem sido recomendado para casos de LSIL pois o resultado é na maioria das vezes positivo para presença de HPV (cerca de 80% com *digene*® HC2 HPV DNA foi apresentado no estudo ALTS - The ASCUS/LSIL Triage Study for Cervical Cancer).

Não existem hoje em dia ferramentas úteis para gerir os resultados de citologia LSIL. Actualmente a orientação de seguimento destas doentes é a colposcopia imediata, com o objectivo de detectar lesões de CIN2+, e a observação com citologia e repetição do teste de HR-HPV ao ano, sabendo-se que cerca de 50% vão fazer o *clearance* aos 6 meses. (Group 2000; Wentzensen N 2006; Wentzensen N 2007; AG 2009; Denton K 2010)

O *kit* CINtec® PLUS é um ensaio de imunocitoquímica que permite a detecção simultânea das proteínas p^{16INK4a} e Ki-67 em lâminas de citologia cérvico-vaginal. (AG 2009)

A proteína p16^{INK4a} é um inibidor da cinase ciclino-dependente que tem sido demonstrado, num elevado número de estudos, estar fortemente sobre-expresso em quase todas as lesões precursoras de HSIL e carcinoma invasor. Esta proteína é reguladora do ciclo celular e é mediada pela proteína pRb (proteína retinoblastoma). A Ki-67 é uma proteína que se pode detectar no núcleo das células apenas quando estão em proliferação, só as células quiascentes ou em G0 não mostram expressão deste antígeno. (AG 2009; Denton K 2010)

As células com sobre-expressão de proteína p16^{INK4a} só podem proliferar activamente se o seu sistema de controlo do ciclo celular estiver alterado, por isso a expressão simultânea de p16^{INK4a} e do marcador de proliferação Ki-67 na mesma célula não deverá ser possível em condições fisiológicas normais. Logo, a expressão simultânea de Ki-67 e p16^{INK4a} deve ser considerada um indicador de desregulação do ciclo celular e consequente transformação celular. Tem sido demonstrada uma sobre-expressão de p16^{INK4a} em cancro do colo do útero que é consequência da inactivação da pRb pela oncoproteína E7 dos vírus de HPV de alto risco. Virtualmente todos os HSIL (CIN2+) mostram uma sobre-expressão de p16^{INK4a}, e a maior parte das células epiteliais em lesões mostra actividade proliferativa. (Wentzensen N 2006; AG 2009; Denton K 2010)

Assim, esta metodologia poderá ser uma ferramenta útil para a gestão eficiente das pacientes com diagnóstico LSIL. O teste de HPV foi proposto para melhorar os resultados do rastreio de CCU, no entanto, continua a existir uma problemática nos casos de LSIL dada a elevada prevalência de infecções transitórias com HR-HPV positivo, o que reduz a

sua especificidade para estes. A realização de colposcopia acarreta custos in comportáveis e um elevado número de mulheres sobretratadas.

Este teste deverá diminuir o número de colposcopias, e dar uma informação mais adequada e com uma maior especificidade a este grupo de mulheres com citologia LSIL. (AG 2009; Tsoumpou I 2009; Denton K 2010)

Este estudo tem, portanto, como principal objectivo determinar se a combinação dos marcadores p16^{INK4a} /ki-67, como novo método de diagnóstico de lesões cervicais de baixo grau, poderá contribuir para uma avaliação de risco imediato de CIN2+ neste grupo de doentes, evitando a colposcopia imediata nos casos CINtec® PLUS negativos.

Assim, esta dissertação foi estruturada do seguinte modo: uma pequena apresentação do *status of the art* em que é feita uma revisão da literatura que permite rever os aspectos teóricos necessários para o estudo, em seguida são apresentados os objectivos do estudo e questões científicas propostas. O procedimento laboratorial e os métodos utilizados são revistos no capítulo Material e métodos. Seguidamente os resultados são apresentados, seguidos da discussão dos mesmos, no capítulo seguinte. Por último, é apresentada a conclusão com resposta ao objectivo geral deste estudo.

CCU

Perspectiva Histórica

Passaram já mais de 2000 anos desde que surgiu, através de Hipócrates, a primeira descrição do CCU, ainda assim, em 2008, registaram-se mais de meio milhão de novos casos, tendo morrido metade das mulheres com esta patologia. (D. 2009)

Durante anos não foi possível fazer qualquer associação entre factor de risco e aparecimento desta doença, nem entender a sua génese.

Foi já em 1842 que o epidemiologista Rigoni-Stern observou que o CCU raramente ocorria em freiras celibatárias, tornando-o pioneiro na percepção do mecanismo patogénico do cancro cervical. (D. 2009)

No início do séc. XX epidemiologistas observaram que o cancro cervical era mais comum em prostitutas, e em mulheres cujos maridos tinham várias parceiras sexuais, e era muito raro em mulheres judias. (D. 2009)

A invenção do colposcópio em 1925 foi um avanço importante no estudo do CCU, mas foi George Papanicolaou que revolucionou este estudo reportando pela primeira vez que o CCU podia ser diagnosticado por um esfregaço cérvico-vaginal em 1928. Mais tarde, em 1943, publicou com o seu colega Herbert Traut um manual sobre o valor do diagnóstico de cancro uterino através da observação do esfregaço vaginal. Ficou para sempre conhecido por ter lançado o *screening* através da metodologia e coloração por ele inventados, e deu nome ao teste que, usado em todo o mundo, reduziu as taxas de incidência de mortalidade por CCU em percentagens impressionantes. (D. 2009)

Em meados dos anos 80, o Prof. Harald Zur Hausen (um virologista alemão) demonstrou pela primeira vez a associação entre o HPV e o cancro do colo do útero. Esta descoberta foi galardoada com um Prémio Nobel da Medicina em 2008. Foi graças a esta informação que foi possível afirmar que o HPV é transmitido por via sexual, e que é essencial para o desenvolvimento da neoplasia cervical. Mais importante ainda, foi o facto de esta descoberta ter vindo a possibilitar o desenvolvimento de vacinas contra o CCU, que hoje representam a fórmula mais avançada para combater esta neoplasia e demonstram já resultados muito promissores na erradicação do CCU. (Kjaer S. 2001; Bosch F 2006; D. 2009)

Epidemiologia

O CCU é ainda uma das neoplasias mais prevalentes em todo mundo sendo, de acordo com dados da IARC (International Agency for Research on Cancer), a segunda mais frequente na mulher. (Bosch F 2006; Schiffman M 2011)

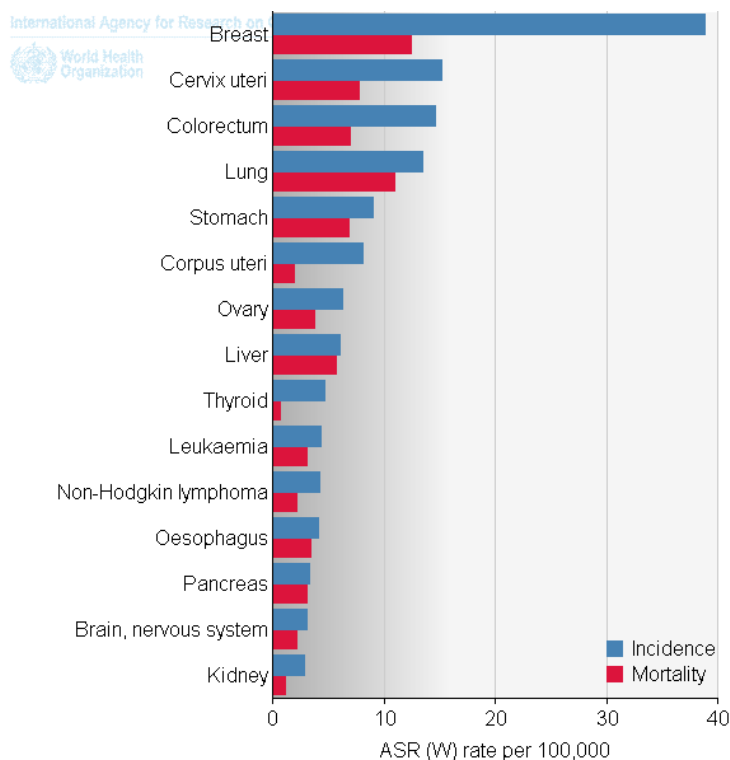


Fig.1 Taxas estimadas de incidência e mortalidade no mundo por 100.000 habitantes (mulheres). A idade é padronizada (ASR - *Age-standardised rate*) – é necessária esta padronização quando se compara populações que diferem em relação à idade já que esta tem uma forte influência no risco de cancro. (Ferlay J. 2010)

Em 2008, aquando do estudo do Globocan, foram estimados 529.000 novos casos de CCU, e cerca de 275.000 mulheres morreram em todo o mundo com esta doença. (Ferlay J. 2010)

A incidência varia com a localização geográfica, apresentando-se como um grave problema de saúde pública nos países subdesenvolvidos, onde as elevadas taxas de incidência e mortalidade são explicáveis pela inexistência de programas de rastreio. Das 275.000 mortes ocorridas em 2008, 88% aconteceram em países em vias de desenvolvimento tendo morrido 159.000 mulheres por CCU na Ásia e 53.000 em África. (GM Clifford 2003; Ferlay J. 2010; Schiffman M 2011)

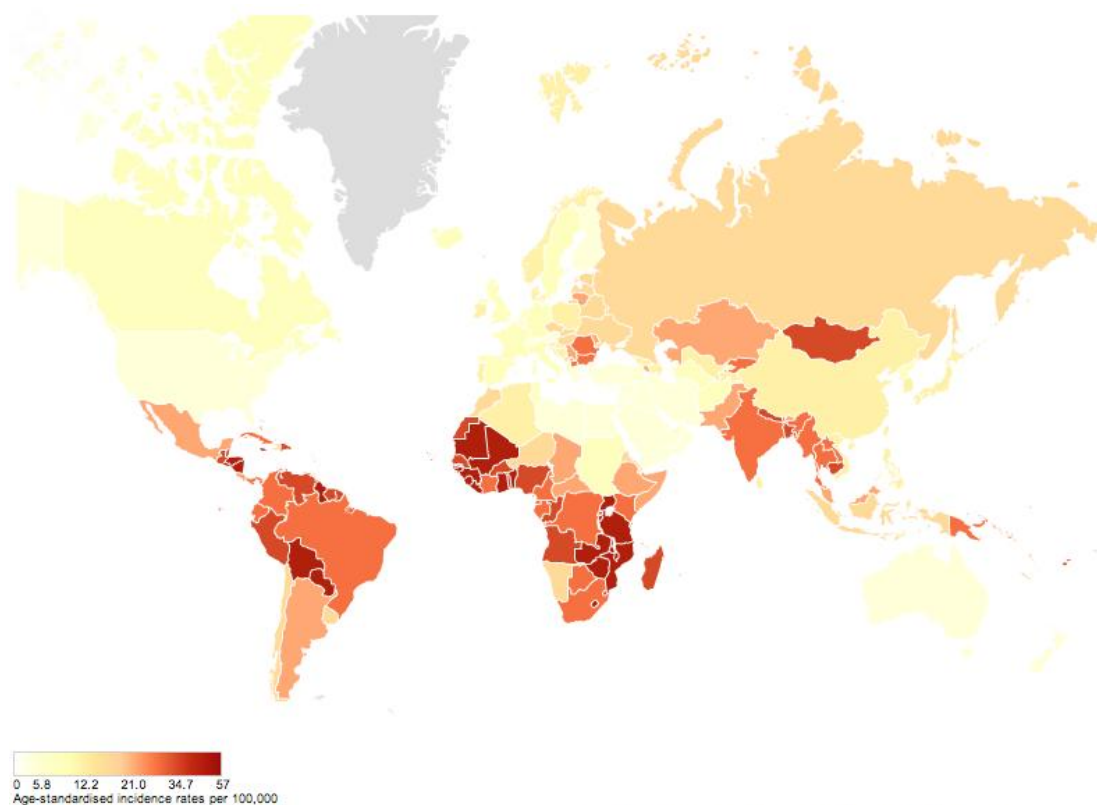


Fig.2 Mapa representativo das taxas de incidência de CCU mundiais (valores por 100.000 habitantes). (Ferlay J. 2010)

Estima-se que em Portugal surjam, anualmente, cerca de 1300 novos casos, tornando-o um dos países com taxa de incidência mais elevada na União Europeia. Portugal continua também a ter uma das mais elevadas taxas de mortalidade da União Europeia. (Medeiros R. 2005; Ferlay J. 2010)

A infecção por HPV é bastante prevalente na população sexualmente activa, principalmente entre os 16 e os 25 anos, sendo a doença sexualmente transmissível mais comum entre estudantes universitários. (Medeiros R. 2011)

Factores de risco e transmissão

O HPV é transmitido por via sexual, a transmissão do vírus ocorre primordialmente através do contacto pele com pele (contacto genital, manual, anal, oral). A maior parte de indivíduos infectados não sabe que o é. E tratando-se de uma infecção assintomática, na grande maioria das vezes podem inconscientemente transmitir o vírus. (Burd 2003)

Estudos epidemiológicos indicam claramente que o risco de contrair infecção genital por HPV e CCU é influenciado pela actividade sexual. Estima-se que cerca de dois terços dos indivíduos que tenham relações sexuais com um parceiro infectado fiquem também eles próprios infectados. O preservativo não garante protecção adequada à exposição do HPV, devido ao possível contágio por contacto cutâneo, mas ajuda na redução da infecção por diminuição da área exposta. (Kjaer S. 2001; Burd 2003; L. 2004)

Embora seja uma situação raríssima é possível que haja contágio através de um fómite (como toalhas, roupa contaminada, instrumentos cirúrgicos...). Outra situação muito rara é a transmissão vertical de mãe para recém-nascido e transmissão transplacentar mãe para feto. (Burd 2003; Arbyn M 2012)

A infecção por HPV é habitualmente uma infecção transitória com uma resolução completa e espontânea em cerca de 75 a 80% dos casos, normalmente ao fim de 12 a 24 meses. É a persistência de infecção por estirpes oncogénicas (que ocorre nos restantes 25%) que pode desencadear o CCU, e são vários os co-factores, desde carcinogénios a factores hormonais, que estão envolvidos no processo de carcinogénese, e que influenciam a forma e rapidez de desenvolvimento da neoplasia. (Ho G. 1998; Kjaer S. 2001; Moscicki A. 2001)

Os co-factores que estão relacionados com a actividade sexual, como a idade precoce da primeira relação sexual, e os parceiros múltiplos ou relações com parceiros que tiveram vários parceiros, constituem elementos que favorecem muito a infecção.

A paridade é também considerada um factor de risco já que foi demonstrado que mulheres com dois ou mais filhos têm um risco de 80% maior de ter lesões intraepiteliais em relação às nulíparas. Isto acontece devido à imunossupressão existente durante o período da gravidez e pelo trauma repetido do colo do útero no parto.

A magnitude da associação entre HPV e CCU é superior à associação entre fumar e cancro do pulmão. O tabagismo pode contribuir para a persistência do HPV ou para uma transformação maligna semelhante à do pulmão devido à diminuição da resposta imunitária e à actividade mutagénica proveniente dos compostos do cigarro. (Burd 2003; Matos A. 2005)

A própria susceptibilidade individual constitui um factor de risco, estando a ela

associada a robustez da resposta imunológica; indivíduos com imunodeficiências têm obviamente maior probabilidade de persistência de infecção por HPV. Tem sido também estudada a associação entre utilização de hormonas esteróides e a paridade como co-adjuvantes da evolução da lesão. (P. 2009)

As infecções concomitantes por outros microorganismos têm sido apresentadas em vários estudos como tendo poder iniciador na carcinogénese do CCU. O citomegalovírus (CMV) , o herpes vírus (HSV) são sugeridos por alguns autores como co-factores no desenvolvimento de CCU através de factores transformadores e oncogenes putativos. A infecção por estes microorganismos leva também à inflamação do colo do útero que está mais susceptível de ser infectado por HPV. No entanto, dados epidemiológicos não são conclusivos quanto a esta associação causal. (Burd 2003; P. 2009)

A hereditariedade genética é descrita como responsável por cerca de 27% dos factores fundamentais contribuintes para o desenvolvimento tumoral. Está ligada à susceptibilidade à infecção por HPV, à capacidade de fazer *clearance* da infecção e mesmo ao tempo de desenvolvimento da doença. Por último existem factores genéticos que podem também favorecer a infecção. Determinados haplótipos HLA (antígenos leucocitários humanos), polimorfismos em genes envolvidos por exemplo na regulação do ciclo celular e reparação de DNA. (Burd 2003; Contracepção 2010-2012)

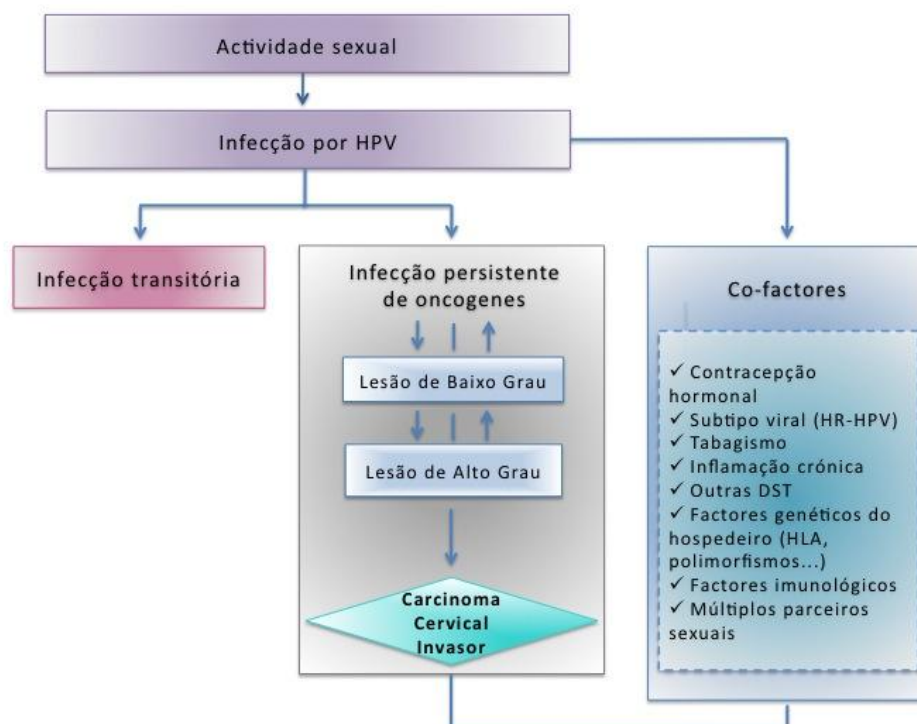


Fig.3 Modelo etiológico da infecção por HPV com destaque para influência dos co-factores adaptado de Eduardo L. Franco(D 2005)

Etiopatogenia

O conhecimento da patogenia do CCU conheceu avanços impressionantes tendo começado a ser descoberta através de factores epidemiológicos e através da apresentação clínica da doença, passando pelo estudo da patologia macroscópica e cito e histopatologia e por fim pela biologia molecular.

O CCU tem uma evolução lenta e progressiva. (Bibbo 1997; Hausen 2002; Contracepção 2010-2012)

A patogénese do CCU tem sido muito estudada e embora não esteja ainda totalmente esmiuçada sabe-se com certeza que a infecção por HPV é um factor etiológico obrigatório para o desenvolvimento do CCU, não sendo a infecção por HPV o único factor suficiente para evolução da neoplasia. (Ferlay J. 2010; Medeiros R. 2011; Pista A. 2011)

Apesar de a infecção por si só não levar ao desenvolvimento da neoplasia, sabe-se que estirpes de alto risco estão presentes em cerca de 99,7% dos CCU. (Burd 2003)

Desde a descoberta do Prof. Harald Zur Hausen que a ligação entre HPV e carcinoma cervical pavimentoso ficou definitivamente estabelecida. (Burd 2003)

Na maior parte dos casos, a infecção por HPV é transitória, mas 10 a 20% pode tornar-se persistente. Se a resposta imunológica local e sistémica não for capaz de eliminar a infecção, as partículas virais podem propagar-se por contiguidade, infectando as células do epitélio circundante. (Contracepção 2010-2012)

A progressão das lesões não tratadas depende da integração do genoma do HPV no DNA da célula hospedeira; isto faz com que haja instabilidade génica que por sua vez origina a replicação de células com acumulação de mutações genéticas – o que leva a que displasias não detectadas evoluam para carcinoma invasor. (Contracepção 2010-2012)

O efeito carcinogénico das estirpes de HPV de alto risco está intimamente ligado às proteínas oncogénicas virais E6 e E7. Estas interagem, inactivam e degradam a p53 e a proteína do retinoblastoma pRb permitindo uma proliferação celular descontrolada. A p53 e a pRb são proteínas de genes oncosuppressores celulares. (Hausen 2002)

Estudos que utilizam PCR quantitativo específico para tipos de HPV de alto risco - 16, -18, -31, -31, e -45 e de baixo risco HPV-6 e -11 demonstram que o HPV-16 pode atingir cargas virais muito mais elevadas que os outros subtipos, e que apenas para o HPV-16 está relacionada a carga viral com aumento de gravidade da doença. (Burd 2003)

A infecção de HPV múltipla (com várias estirpes de HPV) tem tendência a aumentar a gravidade da doença. (Hausen 2002)

Podem ocorrer infecções múltiplas com vários tipos de HPV e as taxas de infecção com dois ou mais tipos de HPV ascendem aos 39%. A presença de infecções múltiplas está também relacionada com o aumento da gravidade da doença, embora a prevalência de genótipos múltiplos seja relativamente baixa em amostras de tecido neoplásico (cerca de 5%). (Burd 2003)

A infecção por HPV-16 e HPV-18 está relacionada com risco elevado de progressão, quando comparada com outros genótipos de HR-HPV, sendo que a progressão para lesão invasiva pode ser aumentada até cinco vezes. (Khan M. 2005)

Citopatologia

O primeiro sistema de classificação citopatológica foi o sistema de Papanicolaou que dividia a interpretação em graus I, II, III, IV e V com ordem ascendente de gravidade. O sistema de classificação de Papanicolaou caiu em desuso nos anos 80 e foi substituído pelo Sistema de Bethesda que trouxe vantagens incontestáveis, especialmente por consistir numa nomenclatura específica, pouco dúbia e facilmente reproduzível. (Bibbo 1997)

O Sistema de Bethesda foi criado em 1988 e foi actualizado pela última vez em 2001. Desde a sua criação que é a classificação mais comum na avaliação da citopatologia cérvico-vaginal. (Bibbo 1997)

Esta classificação segue critérios específicos, verificando-se previamente a adequação da amostra como satisfatória ou insatisfatória para avaliação. Baseia-se depois em características como, tamanho e forma do núcleo, relação núcleo-citoplasmática, hipercromasia nuclear e presença de nucléolos e fundos como diátese tumoral, para fazer a categorização das interpretações.

A interpretação segue os seguintes critérios morfológicos para cada categoria:

- NILM (negativo para lesão intraepitelial ou malignidade), é utilizado para classificar casos em que não há evidência celular de neoplasia. Pode fazer-se referência a organismos causadores de infecção, caso visíveis, e outros achados não-neoplásicos como alterações reactivas. (Bibbo 1997; Henry 2003)
- ASCUS (Células escamosas atípicas de significado indeterminado), usado na presença de núcleos aumentados (um e meio a três vezes o tamanho do núcleo de uma célula intermediária), cromatina finamente granular e uniformemente distribuída, membrana nuclear lisa ou com irregularidade mínima. Pode ocorrer também um fenómeno denominado paraqueratose atípica, que consiste numa queratinização anormal do epitélio escamoso, revelando presença de células escamosas com citoplasma denso e orangófilo. (Bibbo 1997; Henry 2003)
- LSIL (Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau) é utilizado para casos em que haja presença de núcleos de tamanho 3 vezes superior ao das células intermediárias normais, núcleos levemente hipercromáticos, membrana nuclear irregular com pequenas reentrâncias, cromatina finamente granular com eventuais pontos de

cromatina volumosa, leve pleomorfismo e anisocariose, binucleação e naturalmente o aumento da relação núcleo-citoplasmática. O ponto mais característico e importante desta lesão é a presença de coilócitos, que são células com cavidades perinucleares, com irregularidade da membrana e atipia nuclear. Estas células são representativas do efeito citopático do HPV nas células. (Bibbo 1997; Henry 2003)

- HSIL (Lesão intraepitelial escamosa de alto grau), é uma lesão mais severa em que para a classificar é necessário ver uma relação núcleo-citoplasmática aumentada, núcleo a ocupar pelo menos dois terços da área total do citoplasma, membrana nuclear irregularmente espessada com depósitos de cromatina à periferia – fendas e invaginações, hipercromasia, anisocariose, o tamanho de células é variável e podem existir nucléolos. (Bibbo 1997; Henry 2003)
- Carcinoma de células pavimentosas exige já a visualização de despolarização celular e consequente aparecimento de muitas células isoladas, núcleos grandes e hipercromáticos com nucléolos proeminentes e eventuais mitoses, células com formas bizarras (fusiformes, *tadpole*...). Habitualmente é a presença de diátese tumoral que sendo constituída por restos necróticos ajuda a garantir a presença de lesão invasora. (Bibbo 1997; Henry 2003)

A designação utilizada na citologia tem uma correspondência na histologia, que é aqui apresentada: o NILM corresponde ao “normal” da histologia, o LSIL é correspondente ao CIN1 (displasia leve) da histologia, o HSIL da citologia agrupa dois diagnósticos histológicos o CIN2 e CIN3 (displasias moderadas e severa) e por fim o carcinoma invasor que tem a mesma designação na histologia.

Histopatologia

A terminologia de lesões escamosas do tracto anogenital associadas a HPV tem uma longa história marcada por termos díspares derivados da influência de várias especialidades médicas e nem sempre demonstra o conhecimento da biologia e patogénese de HPV.

As classificações de Richart e de Reagan foram as mais utilizadas ao longo dos últimos anos. A terminologia de Reagan classifica as lesões pré-malignas por classes de displasia que ascendem desde a leve, à moderada e por fim à displasia severa. (Cotran R. 2000)

Em 1992 foi criado um novo sistema de classificação, o Sistema de Bethesda, que criou o termo lesão intraepitelial escamosa (SIL) e dividia as lesões em LSIL (baixo grau) e HSIL (alto grau que compreende o CIN2 e 3). Esta nomenclatura é utilizada principalmente nos EUA nunca tendo conseguido impor-se na Europa. O termo lesão apareceu para enfatizar que as alterações morfológicas em que o diagnóstico é baseado não representam necessariamente presença de um processo neoplásico. Este sistema pretendia aproximar a nomenclatura utilizada na histologia da usada na citologia. (Cotran R. 2000)

Recentemente foi conseguido um consenso para recomendar uma nomenclatura histológica apropriada aos actuais conhecimentos de HPV, novos biomarcadores e facilitar a comunicação entre as várias especialidades médicas. O projecto LAST (nomenclatura escamosa do tracto anogenital) foi proposto em 2012 mas a sua aplicação gera ainda controvérsia e não é ainda aplicada na maior parte dos locais. (Darragh T. 2012)

A classificação mundial proposta por Richart é a mais comumente usada em Portugal e foi a utilizada neste estudo. Esta classificação é também conhecida por Classificação de CIN (neoplasia intraepitelial cervical). O termo CIN foi introduzido em 1968 para indicar uma vasta série de atipias celulares limitadas ao epitélio e era dividida em graus 1, 2 e 3. A classificação subdividia-se assim em: normal, CIN1 (correspondia à displasia leve), CIN2 (displasia moderada), CIN3 (displasia grave e CIS) e carcinoma invasor. (Henry 2003)

Esta terminologia é baseada em vários critérios morfológicos de forma a prever o comportamento biológico do epitélio com lesão. As características avaliadas mais importantes são: o grau de diferenciação do epitélio, a relação núcleo citoplasmática, a maturação celular e a análise nuclear (maturação e actividade mitótica). (Cotran R. 2000; Darragh T. 2012)

O CIN 1 apresenta alterações nucleares leves e poucas figuras de mitose. As células indiferenciadas ficam limitadas ao terço inferior do epitélio (camadas mais profundas). Pode eventualmente observar-se atipia colócítica na total espessura do epitélio. Esta presença de colócitos é indicativa do efeito citopático viral, representado por halos citoplasmáticos e que representa o rompimento do citoesqueleto. (Bibbo 1997; Cotran R. 2000)

O aparecimento de células atípicas nas camadas inferiores do epitélio escamoso, nomeadamente nos dois terços inferiores do epitélio representa já uma lesão de CIN2. As células atípicas exibem alterações na relação núcleo citoplasmática, perda de polaridade, anisocariose, hipercromasia e ainda é possível a observação de número aumentado de mitoses (inclusive mitoses anormais). (Bibbo 1997; Cotran R. 2000)

Por fim, a perda progressiva de diferenciação com comprometimento de cada vez mais camadas de epitélio, até que este seja totalmente substituído por células atípicas imaturas sem qualquer diferenciação de superfície, é característica de uma lesão de CIN3. As alterações nucleares observam-se em toda a extensão do epitélio com figuras de mitose numerosas e com formas bizarras. (Bibbo 1997; Cotran R. 2000)

Estas células expressam as alterações precoces associadas ao efeito dos oncogenes E6/E7 no ciclo celular. Há uma desregulação do ciclo celular e aumento da expressão da proteína p16^{INK4a} como resposta compensatória às alterações celulares que as provocam, como vai ser descrito seguidamente. (Cotran R. 2000; Carozzi F 2008; Tsoumpou I 2009)

Prevenção – rastreio e vacinas

Entre todos os tumores malignos o CCU é aquele que pode ser mais eficazmente controlado pelo *screening*. O *screening* de citologia cervical é o método de rastreio para cancro mais bem sucedido em toda a história da medicina. O motivo pelo qual é tão eficaz na prevenção do CCU é que a detecção de lesões precursoras e o tratamento de mulheres com lesões de alto grau evita o desenvolvimento para cancro. Estas lesões precursoras de carcinoma podem existir no estado não invasivo durante um período de um até vinte anos. (Cotran R. 2000; M. Arbyn 2010)

Estas lesões podem sofrer regressão espontânea ou, mediante persistência de infecção viral, progredir para lesões mais avançadas e até carcinoma invasor. (Cotran R. 2000)

A IARC confirma a eficácia do *screening* de carcinoma do cérvix para mulheres entre 25-65 anos reduzindo a mortalidade. O *screening* citológico de uma população pode reduzir a incidência de CCU até 80%. (M. Arbyn 2010)

Nos EUA a incidência de cancro cervical diminuiu mais de 70% entre 1950 e 2000, o que representa o sucesso do rastreio. (M. Arbyn 2010)

Há já cerca de 10 anos que as vacinas contra o HPV são estudadas. Espera-se que a vacina venha a reduzir o risco de ter CCU em cerca de 44% (P. 2009) (Tjalma 2006)

A vacina fornece imunidade cruzada pelo que protege de outros tipos para além dos tipos de HPV a que se propõe. (Tjalma 2006)

Com o programa de vacinação é esperada uma redução do número de mortes por CCU mas também um declínio da infecção por HPV. (Tjalma 2006; R. 2009)

São actualmente comercializadas duas vacinas, uma quadrivalente (protege para os subtipos -16, -18, -6 e -11) e uma bivalente (-16 e -18). O método utilizado para produção de vacinas não é através do próprio vírus HPV, mas sim o resultado de engenharia genética para modificação de partículas virais, uma tecnologia recombinante que consiste numa espécie de auto-montagem de partículas semelhantes a vírus, que têm demonstrado elevada imunogenicidade. (Madrid-Marina V. 2009; R. 2009)

As partículas semelhantes a vírus (*virus like particle* - VLP) são conseguidas através da clonagem dos genes da cápside vírica de diferentes tipos de HPV, sendo seguidamente inseridas em vectores. São portanto compostas por essa cápside viral, sem qualquer material genético no seu interior. Na verdade, é um pseudo-vírus, sendo que cada subtipo viral tem a correspondente VLP para uso como vacina. Assim, uma vacina bivalente tem duas VLP (16, 18). Já uma vacina quadrivalente tem quatro VLP (6, 11, 16, 18). (Papillomavirus 2004)

As VLP imitam o vírus do HPV fazendo com que o organismo identifique aquela estrutura como um invasor e produza contra ele uma resposta imunitária forte. No fabrico de estas VLP não são envolvidos derivados de células humanas e por isso não há risco infeccioso nem oncogénico. (Papillomavirus 2004)

As vacinas têm a capacidade de diminuir notavelmente os casos de CCU graças à sua imunogenicidade e têm sido eficientes na prevenção de lesões e infecções persistentes não só do colo do útero, mas também da vagina, vulva e ânus. (Madrid-Marina V. 2009)

As vacinas para o HPV são ainda muito caras e é por isso impraticável a sua implementação nos sistemas de saúde de alguns países, especialmente naqueles em vias de desenvolvimento. A implementação tem sido feita vacinando raparigas jovens pois a vacina terá um maior sucesso se tomada antes do primeiro contacto sexual. (R. 2009)

Desde 2008, o programa nacional de vacinação abrangeu a faixa etária das raparigas com 13 anos e um programa de repescagem de raparigas com 17 anos, permitindo assim abranger raparigas nascidas entre 1992 e 1999 até 2011. (Pista A. 2011)

Está neste momento a estudar-se o resultado desta era pós-vacinação e é necessário gradualmente alterar as formas de rastreio de CCU. Espera-se que diminua a incidência de CCU, mas a vacina não abrange todos os tipos de HPV. Por outro lado, a população pode começar a desenvolver uma resistência à vacina, ou o aparecimento do CCU pode começar a associar-se com mais frequência a outros tipos de HPV, por isso é necessário continuar a acompanhar as mulheres em rastreio de CCU. As estratégias, é que, têm de ser alteradas de forma a aproveitar as vantagens custo-benefício da combinação da vacinação com o rastreio. Começa a pôr-se em prática a utilização de estratégias de rastreio que dão prioridade aos testes de HPV e um papel secundário à citologia. (K. Syrjanen 2010)

Estudos revelam que a vacina de HPV é segura e que a sua utilização reduz cerca de 70% a probabilidade de desenvolver CCU. (Medeiros R. 2011)

Em suma, os factores cruciais para o sucesso do rastreio são: educação (informação na escola/médico de família sobre o que é o HPV, transmissão e comportamentos de risco, vacinação...), o *screening* e essencialmente a vacinação alargada.

HPV

Definição – estrutura e organização genómica

O HPV pertence à família Papillomaviridae, género Papillomavirus e é um vírus pequeno que infecta tecidos epiteliais e mucosos do colo do útero, vagina, vulva, áreas perianais, pénis, cavidade nasal e orofaríngea, das mãos e dos pés, sendo capaz de provocar lesões na pele e ou nas mucosas. (L. 2004)

A maior parte das infecções por HPV são benignas e o HPV foi inicialmente reconhecido como agente causal de verrugas cutâneas nas mãos e nos pés. (Burd 2003)

Existem mais de 140 tipos de HPV identificados, sendo que, cerca de 40 são mucotróficos, isto é, afectam principalmente o tracto anogenital. Cerca de 60% provocam outras doenças como verrugas nas mãos e pés. Podem ser detectados subtipos oncogénicos de HPV em virtualmente todos os CCU, pelo que a presença de HPV é um factor necessário para o aparecimento desta doença. (L. 2004; F 2006; Contracepção 2010-2012)

O vírus tem apenas 50 a 55nm e uma estrutura icosaédrica, que vista através de microscopia electrónica tem a aparência de uma bola de *golf*. Não possui invólucro lipídico e contém uma dupla hélice (ds) circular de DNA embora somente uma cadeia seja transcrita. (Villiers E. 2004)

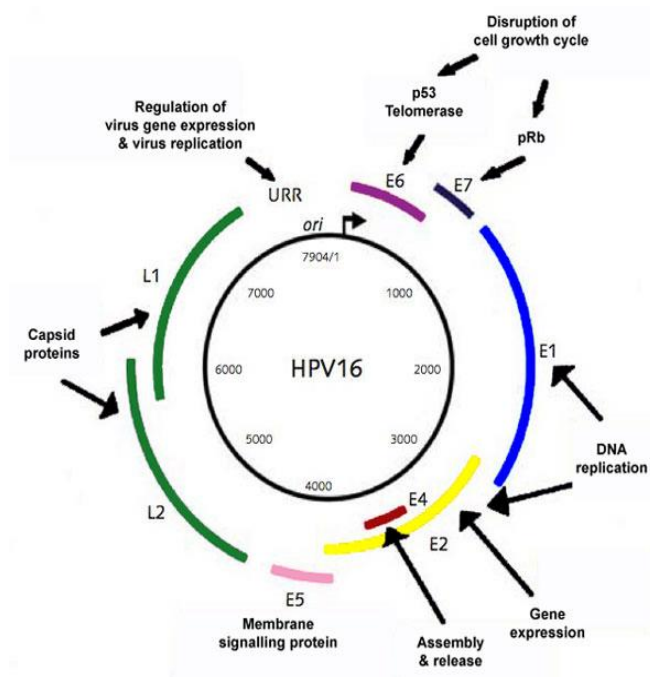


Fig.4 Esquema representativo do genoma do HPV-16 adaptado de *microbiologybytes* (2009)

O genoma do HPV está associado a proteínas semelhantes a histonas envolvidas por um capsídeo formado por 72 subunidades proteicas denominadas capsómeros que são compostos por duas proteínas estruturais a L1 (maior e género-específica) e a L2 (menor e altamente específica). Cada capsómero é um pentâmero da proteína maior da cápside a L1. Cada virião contém várias cópias (cerca de 12 por virião) da proteína da cápside *menor* a L2. A cápside viral é constituída principalmente pela proteína L1 que representa cerca de 80 a 90% do conteúdo proteico da cápside e em menor grau pela L2. (Leto MG 2011)

O seu genoma viral apresenta cerca de 8000 pares de bases e está dividido em 3 regiões génicas, de acordo com a sua função e localização. (Villiers E. 2004)

Todas as sequências codificadoras de proteínas (*open reading frame*, ORF) estão restritas a apenas uma cadeia da hélice, e são oito as que constituem o genoma do vírus. O genoma está ainda dividido funcionalmente em três regiões diferentes, duas codificantes e uma não codificante. (Burd 2003)

As regiões codificantes contêm ORF e a expressão destas sequências é dependente da fase de diferenciação da célula do hospedeiro. A primeira é uma região não codificante (*non coding region*, NCR), a região de controlo longa (*long control region*, LCR) ou a região reguladora (*upstream regulatory region*, URR). Situada entre os genes L1 e E6 esta região também contém o grau mais elevado de variação do genoma viral, contendo 400 a 1000 pares de bases que não codificam proteínas, são apenas necessários à regulação da expressão genética. Esta região contém sequências reguladoras de genes virais, especialmente o promotor, contendo locais de ligação específicos para as polimerases do DNA ou RNA e outros factores que potenciam ou reprimem a expressão dos genes virais. É uma região pouco conservada é aqui que se localizam os genes reguladores e iniciadores da replicação viral. (Burd 2003)

A segunda é uma região precoce (*early region*, E) codifica os ORF de E1 a E8 (8 genes) que estão envolvidos na replicação viral, no controlo da transcrição, na maturação viral e transformação celular, isto é, o potencial oncogénico do vírus. A terceira, denominada região tardia (*late region*, L), codifica os ORF L1 e L2 que codificam as proteínas estruturais homónimas, que têm capacidade de se auto-agregarem e que assim constituem a cápside viral. (Leto MG 2011)

Os produtos dos dois genes precoces E6 e E7 actuam como oncoproteínas, sendo expressos nos CCU onde têm função de inactivar os produtos celulares dos genes supressores tumorais p53 pRb, o que faz com que haja proliferação descontrolada. (Leto MG 2011)

Os genes mais conservados nos vários subtipos de HPV são E1, E2, L2 e principalmente o L1. (Leto MG 2011)

A sequência de aminoácidos da proteína L1 é francamente conservada entre todos os subtipos de HPV. Presume-se que na formação de novas partículas virais, a proteína L2 tenha como função atrair o DNA viral para dentro da cápside originando o encapsulamento do genoma. As proteínas da cápside vão originar determinantes antigénicos específicos para cada subtipo viral, que depende da conformação da cápside e não das proteínas isoladas.(Burd 2003)

Classificação do HPV

Os HPV foram classificados em subtipos de acordo com a homologia da sequência nucleotídica. Quando a homologia é inferior a 50% é definido um novo tipo, tendo sido atribuído uma numeração de acordo com a ordem da descoberta do mesmo. Se a semelhança for superior a 50% é considerado um subtipo do vírus. No entanto, quando a homologia é próxima de 100% os vírus consideram-se variantes do mesmo tipo. (Villiers E. 2004; Leto MG 2011)

Uma outra forma de classificação prende-se com o facto de, por definição, as sequências de nucleotídeos dos genes E6, E7, e L1 de um novo tipo de HPV não deverem ser mais de 90% homólogas à sequência correspondente dos tipos de HPV conhecidos. Isto é, quando há uma diferença de 10% relativamente a outros tipos já conhecidos descreve-se um genótipo novo. (Villiers E. 2004)

Algumas variantes têm propriedades biológicas e bioquímicas diferentes e importantes no risco de cancro. E apesar de existir esta classificação, as diferenças entre os grupos evolutivos traduzem as diferenças existentes na biologia de vírus diferentes. (Villiers E. 2004)

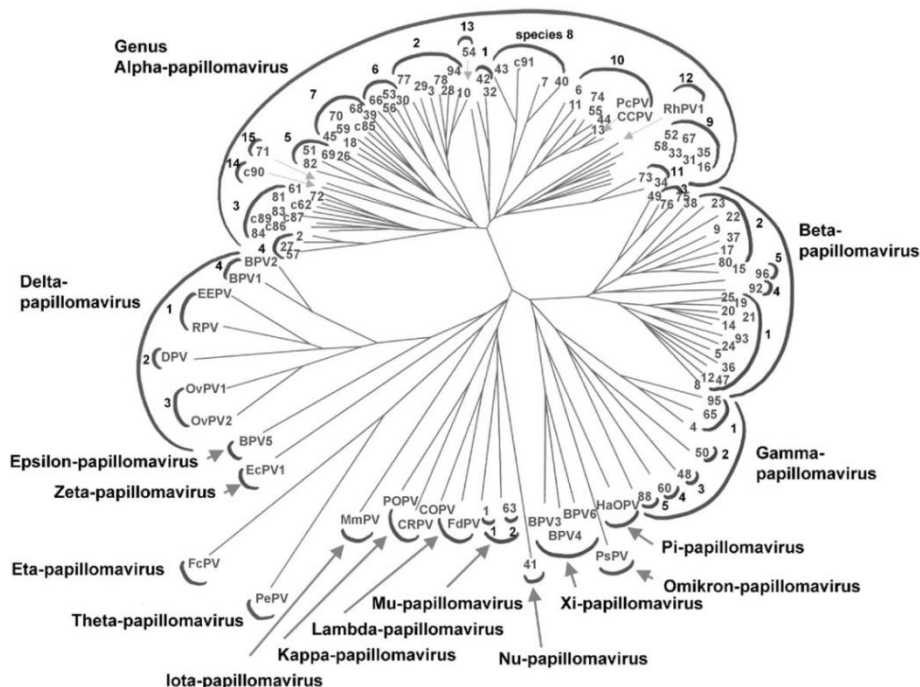


Fig.5 Árvore filogenética contendo as sequências de 118 tipos de papilomavírus. Os números no final de cada ramo identificam um tipo de HPV. O semi-círculo externo identifica o gênero do papilomavírus, e o número no interior do semi-círculo refere-se à espécie do papilomavírus. (Villiers E. 2004)

Os HPVs foram agrupados em vários géneros: Alpha, beta, gamma, delta, mu, nu... O grupo clinicamente mais importante, e o maior, é o grupo dos papilomavírus Alfa, e engloba os vírus que afectam o tracto ano-genital, e alguns a capacidade de infectar a mucosa oral. (Villiers E. 2004)

A maior parte dos tipos de HPV oncogénicos estão filogeneticamente relacionados ou com o HPV-16 (-31, -33, -35, -52 e -58) ou com o HPV-18 (-39, -45, -59 e -68). (Villiers E. 2004; Medeiros R. 2005)

Para além desta classificação os vírus são classificados como baixo ou alto risco consoante o seu potencial oncogénico. Os genótipos de alto risco são determinantes, mas não suficientes para o desenvolvimento de CCU. (Contracepção 2010-2012)

Os tipos de HPV considerados como carcinogénicos são: -16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58. O HPV-68 é considerado como provavelmente carcinogénico.

O grupo dos HPV possivelmente carcinogénicos (grupo 2b) inclui os tipos: -26, -53, -66, -67, -70, -73 e -82. Por último existe o grupo dos HPV de baixo risco que engloba os tipos: -6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -72, -81, -CP6108. (P. 2009; Schiffman M. 2009)

O vírus -66 está incluído também no grupo detectado pelo teste Abbott RealTime HR HPV, pelo cobas® HPV e pelo Cervista® HPV 16/18. Em 2005, o subtipo -66 estava classificado como provavelmente carcinogénico, e passou em 2009 ao grupo dos possivelmente carcinogénicos. Este intervalo de quatro anos, entre as reuniões do IARC, teve impacto no desenvolvimento de novos ensaios de HPV. Em 2005, o único ensaio validado pela Food and Drug Administration (FDA) era o *digene*® HC2 HPV DNA. Os testes criados neste intervalo temporal incorporaram no seu painel o HPV-66, sendo este o único vírus pertencente ao grupo 2b englobado nos testes de nova geração. (Schiffman M. 2009)

Um factor emergente importante no desenvolvimento da neoplasia cervical é o papel das variantes de HPV. As variantes diferem nas propriedades químicas e biológicas e na patogenecidade. Baseados na variação de sequências de L1, L2, e regiões LCR, cinco *clusters* filogenéticos, que ocorrem na natureza foram definidos para o HPV-16: a europeia, a asiática, a asio-americana, a Africana-1 e a Africana-2. Estas variações de sequências intratípicas também foram encontradas nos genes E2, E4, E5, E6 e E7 do HPV-16. Como existem nestes locais vários pontos de ligação com factores de transcrição, a variação de sequência nucleotídica pode ter significado funcional. A oncogenecidade das variantes específicas de HPV parece variar geograficamente e com a etnia de origem da população estudada. (Burd 2003)

Epidemiologia do HPV

O HPV-16 e HPV-18 são subtipos víricos de alto risco responsáveis por mais de 75% dos cancros cervicais em Portugal. (Pista A. 2011)

Cerca de 70% dos casos de CCU registados em todo o mundo são causados por HPV-16 (55%) e HPV-18 (15%). (Smith J. 2007)

A infecção por HPV é muito comum em mulheres entre os 18 e os 64 anos, tendo sido extrapolado após estudo *The CLEOPATRE Portugal Study* o valor de prevalência de 12,7% para a população feminina em geral. Este estudo foi efectuado com uma metodologia não comparável com dados internacionais, porque o teste utilizado, CLART® HPV2, não tem a mesma *performance* conseguida os *primers* GP5/GP6 ou o PGMY utilizados com o LINEAR ARRAY® HPV. A prevalência de infecção por HPV é mais elevada em mulheres com menos de 25 anos, e menos importante para diagnóstico sendo por isso indicada a realização de rastreio com teste de HPV apenas a mulheres com mais de 25 ou até mesmo 30 anos. (Pista A. 2011)

Como era esperado o subtipo mais comum em Portugal é também o HPV-16, sendo os outros mais comuns o -31, -51, -53 e -66. (Pista A. 2011)

Os genótipos de HPV presentes nas vacinas bivalente e quadrivalente foram detectados em 24,2% e 32,6% das mulheres infectadas com HPV. Isto demonstra um esboço do benefício que a vacina irá ter na população portuguesa. (Pista A. 2011)

As infecções múltiplas são mais comuns em mulheres com lesão, sendo que são muito menos comuns em mulheres com citologia normal (32,3%). (Pista A. 2011)

Papel do HPV na carcinogénese

O CCU tem início em lesões intraepiteliais que evoluem ao longo dos anos para carcinoma invasor, se nada for feito. A grande maioria dos CCU ocorre na zona de transformação (zona de transição entre epitélio escamoso estratificado do exocolo e epitélio colunar no endocolo. As células deste local estão em constante proliferação tornando este local mais propício ao desenvolvimento do vírus. (Bibbo 1997; Leto MG 2011)

A maior parte dos CCU são provocados por subtipos víricos de alto risco, estando os HR-HPV envolvidos em 99,7% de casos de carcinomas cervicais escamosos em todo o mundo. No entanto, ao contrário do que muitas vezes é referido, as estirpes víricas de baixo risco de HPV podem também estar envolvidas no CCU, tendo sido já descritos casos ocasionais e raros em que subtipos víricos de baixo grau foram encontrados em carcinomas cervicais. (Burd 2003; Munger K. 2004)

Os papilomavirus adaptam-se naturalmente ao tecido do seu hospedeiro, à diferenciação das células epiteliais da mucosa, explorando a maquinaria celular do hospedeiro para uso próprio.

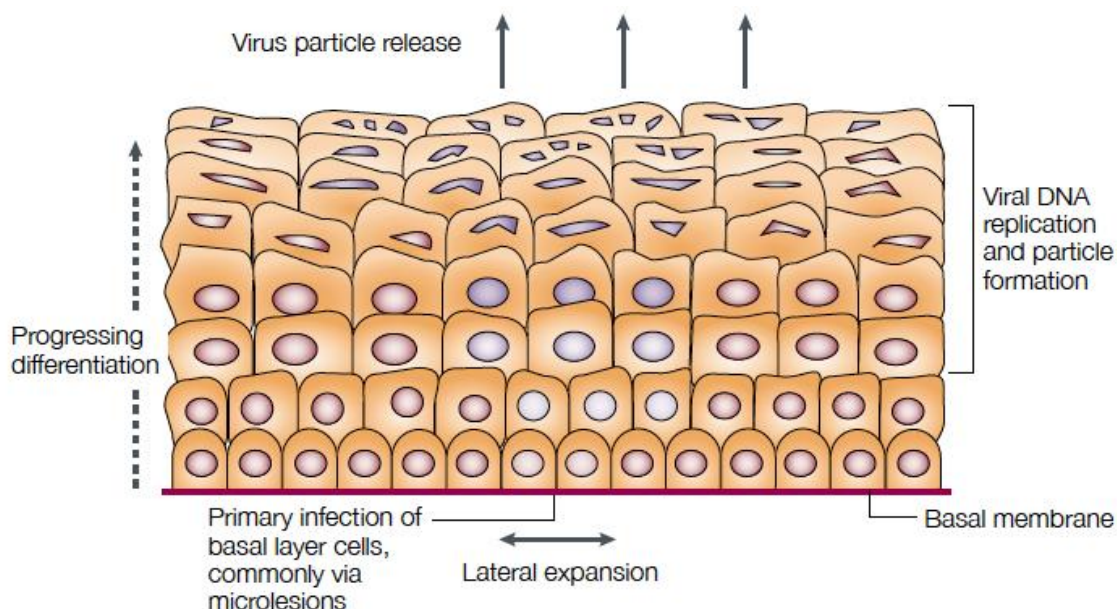


Fig.6 O ciclo do HPV. A infecção requer a disponibilidade da camada basal, que ocorre habitualmente por micro-lesões da pele ou mucosa. A célula infectada divide-se e a população espalha-se lateralmente. Algumas das células descendentes migram para as camadas superiores em divisão, onde os genes virais são activados. O DNA viral é replicado e as proteínas da cápside são formadas. Deste processo resultam partículas virais que são libertadas na superfície e podem infectar outros tecidos. (Hausen 2002)

O ciclo de vida do vírus está intimamente ligado à diferenciação das células epiteliais. Todo este processo tem início quando o vírus chega à camada basal do epitélio onde o genoma do HPV entra no núcleo da célula do hospedeiro e é replicado conjuntamente com o DNA celular. O epitélio do colo do útero sofre ao longo da vida pequenos traumatismos através das relações sexuais, pequenas infecções e outros que produzem pequenas fissuras no epitélio e que o tornam sensível à entrada do vírus que é feita através da camada basal. (Munger K. 2004)

Estas lesões do epitélio permitem que ocorra um dos fundamentais passos da carcinogénese induzida pelo HPV, que é a integração do genoma do HPV no cromossoma do hospedeiro.

A carcinogénese do CCU baseia-se na integração do DNA viral no genoma da célula alvo, o que envolve a linearização do genoma viral entre os genes E1 e L1. Outro acontecimento simultâneo é a inactivação do gene E2 por deleção no momento da integração. A proteína codificada pelo gene E2 é responsável pela regulação da expressão dos genes E6 e E7. O que significa que uma vez perdendo a sua função induz a expressão descontrolada dos genes E6 e E7 levando a alterações fenotípicas na célula hospedeira.

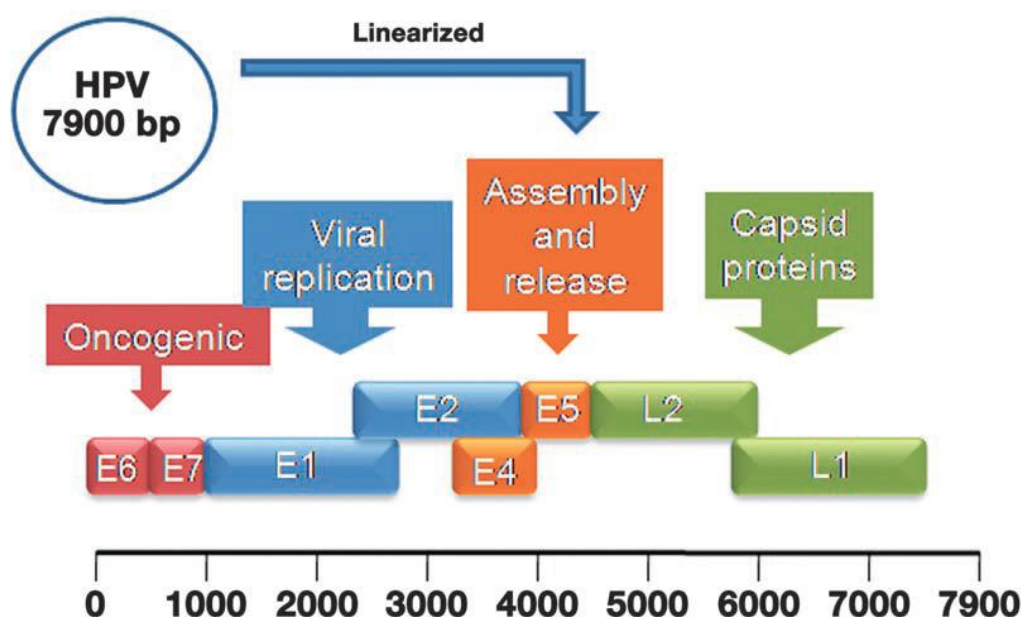


Fig.7 Esquema do genoma do HPV numa forma linear, mostrando a localização das 8 ORF sobrepostas. O gene L1, que codifica a proteína da cápside viral, é o primeiro alvo para amplificação e detecção de DNA de HPV. Os genes E6 e E7 são responsáveis pelo papel do HPV na carcinogénese. (K. 2010)

As proteínas E6 e E7 codificadas pelos genes homónimos de HR-HPV são responsáveis pelo potencial oncogénico do vírus, e assim pela sua capacidade de provocar a transformação maligna das células infectadas.

Os alvos destas oncoproteínas são a pRb (alvo do gene E6) e p53 (alvo do gene E7), e estas proteínas são codificadas por genes supressores tumorais.

A proteína E6 dos HR-HPV forma um complexo com a p53 levando à sua degradação pela via proteolítica dependente da ubiquitina. Consequentemente todas as funções normais da p53, como indução da paragem do ciclo celular em G1, apoptose e reparação de DNA não são executadas. A p53 controla também os *checkpoints* G1/S e G2/M do ciclo celular, mas uma vez degradada há uma perda destes *checkpoints* o que pode originar duplicações cromossómicas e anomalias centroméricas. (Munger K. 2004)

A proteína E7 liga-se à forma hipofosforilada da pRb (forma activa) e mais uma vez é degradada pelo proteassoma por ubiquitinação. A pRb habitualmente impede a entrada na fase S ligando-se ao factor de transcrição E2F. (Munger K. 2004)

Assim, os dois oncogenes virais funcionam concomitantemente para promover a síntese de DNA, bloqueando a paragem de crescimento mediada pela p53 e a apoptose das células alteradas.

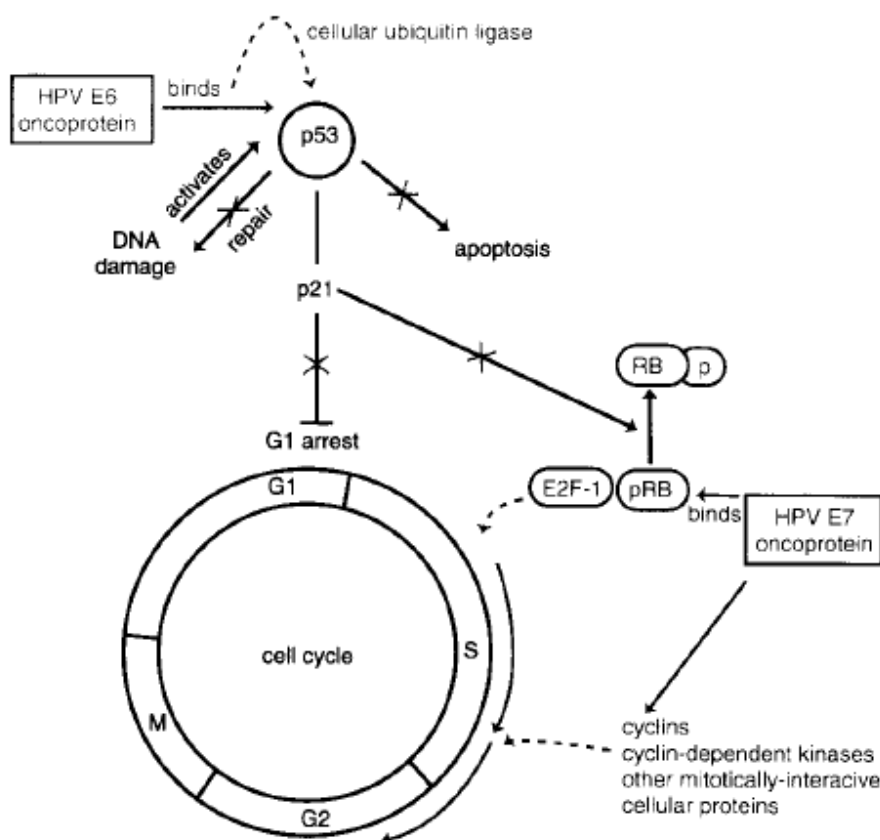


Fig.8 Representação da oncogénese do HPV. Os genes E6 e E7 codificam proteínas homónimas que se ligam às proteínas celulares p53 e pRb adulterando as funções destas e as vias de regulação do ciclo celular, acabando por levar à transformação celular(Burd 2003)

A E5 é outra proteína viral que tem vindo a ser demonstrado também ter influência no ciclo de vida do HPV. Parece trabalhar em simultâneo com o EGFR (*epidermal growth factor receptor*).

A E5 é aparentemente importante na fase inicial da infecção, estimulando a proliferação celular, que resulta na entrada e progressão do ciclo celular através da regulação da p27 (Kip 1), afectando várias vias celulares envolvidas na adesão, motilidade celular e sinalização mitogénica. Estas alterações podem levar mesmo à inibição da apoptose e facilitar a persistência da infecção no epitélio cervical.

A proteína E5 parece ter fracas propriedades oncogénicas que ocorrem por inibição da apoptose após lesão do DNA. No entanto, à medida que as lesões associadas a infecção por HPV progridem até cancro, o DNA viral integra-se no DNA da célula hospedeira, e uma parte substancial do genoma viral sofre deleção, incluindo a sequência codificadora da E5. Logo, a E5 não será necessária para os eventos tardios da carcinogénese mediada por HPV.

Em suma, o conjunto dos oncogenes virais E5, E6 e E7 desempenha um papel crucial na transformação celular por variados mecanismos que afectam o funcionamento celular normal.

Uma vez dentro da célula do hospedeiro, o DNA do HPV replica à medida que as células basais se diferenciam e progridem para a superfície do epitélio. Nas camadas basais, a replicação viral é considerada não produtiva e o vírus estabelece-se a ele próprio como um epissoma de poucas cópias, utilizando a maquinaria de replicação do hospedeiro para sintetizar o seu DNA em média uma vez por ciclo celular. Nos queratinócitos diferenciados nas camadas suprabasais do epitélio, o vírus sofre alteração para um modo *rolling-circle* de replicação de DNA, amplifica o seu DNA para elevados números de cópias, sintetiza proteínas da cápside e faz com que ocorra a montagem do vírus. (Burd 2003)

Métodos moleculares de detecção de HPV

O vírus de HPV não pode ser desenvolvido em culturas celulares pois a progressão da infecção depende da maturação do epitélio, isto é, a infecção por HPV está limitada às células epiteliais e apenas com a diferenciação celular é activado o ciclo celular do vírus. O diagnóstico de presença de HPV pode ser inferido por achados morfológicos, serológicos e clínicos. (Villa L. 2006)

Sendo o HPV causa necessária para o desenvolvimento do CCU é essencial a detecção da presença/ausência deste nas amostras cervicais. Esta informação tem vindo a tornar-se cada vez mais relevante nas últimas décadas e é decisiva para fazer um acompanhamento e tratamento adequado de cada paciente. (Villa L. 2006)

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, que permitiram a sequenciação de genoma de diversos vírus de HPV, são variadíssimas as metodologias disponíveis para detecção de HPV. (Villa L. 2006)

Hoje em dia, são múltiplas as técnicas de detecção de HPV, mas baseiam-se essencialmente em duas metodologias diferentes: ou são efectuadas por hibridização directa de DNA ou RNA viral, ou por amplificação desses genomas seguido de identificação específica.

Abbott RealTime HR HPV

É um ensaio de PCR (*polymerase chain reaction*) em tempo real, qualitativo *in vitro* que faz detecção de genótipos do vírus de HPV, utilizando uma amplificação de DNA alvo e tecnologia de detecção de DNA de HPV de alto risco em células cervicais de colheitas em meio líquido. (Cuzick J. 2010; Laboratories 2010)

Detecta 14 genótipos de HR-HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e genotipa parcialmente o genótipo 16 e 18 dos outros 12 genótipos de alto risco na mesma reacção. Consiste numa tecnologia de Multiplex PCR em tempo-real. (Laboratories 2010)

Este produto segue os requisitos de conformidade obrigatórios para serem comercializados no Espaço Económico Europeu, isto é, é um produto com marcação CE-IVD.

A detecção de HR-HPV é feita através de uma *primer mix* que tem como alvo uma região conservada dos genomas de HPV e também sondas de DNA de cadeia simples. A *primer mix* tem 3 *primers* no sentido de 5' para 3' e 2 *primers* no sentido de 3' para 5'. O alvo é uma região conservada do gene L1. O sinal emitido pela presença de HPV de um

destes 14 genótipos é gerado através de sondas marcadas com fluorocromos. (Laboratories 2010)

Produtos amplificados do controlo interno são gerados com um conjunto de *primers* que têm como alvo a β -globina humana endógena. A detecção da sequência de β -globina é usada como controlo de validade da amostra (validando a mesma quanto à proporção celular, extracção de DNA da amostra e eficiência da amplificação). As sondas HPV-16, -18, para outros genótipos e controlo interno são todas marcadas com diferentes fluorocromos distinguindo os sinais numa mesma reacção. (Cuzick J. 2010)

A extracção é feita por tecnologia de partículas magnéticas.

A amplificação de HPV e controlo interno (os dois alvos) ocorre simultaneamente na mesma reacção. A sequência-alvo situa-se na região conservada do gene L1 do genoma do HPV, e foi concebida uma *primer mix* para hibridizar regiões de consenso dos genótipos do HPV de aproximadamente 150 bases. A sequência-alvo do controlo interno é uma região de 136 bases gene de β -globina humana endógena. (Laboratories 2010)

A detecção é lida através da fluorescência que é emitida pelos produtos de amplificação e é denominada fluorescência em tempo real.

O sinal produzido é gerado pela utilização de sondas fluorescentes. Cada sonda tem diferentes fluorocromos para que os sinais sejam distintos e seja possível observá-los a todos numa só reacção.

cobas® HPV

É um teste qualitativo *in vitro* que utiliza amplificação de DNA alvo através de PCR e simultânea hibridização de ácidos nucleicos para detecção de 14 genótipos de HR-HPV, tudo numa só análise. Identifica os tipos HPV-16 e HPV-18 enquanto detecta simultaneamente os restantes genótipos de alto risco (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68), em níveis de infecção clinicamente relevantes.

O teste cobas® HPV® utiliza *primers* para definir uma sequência de aproximadamente 200 nucleótidos dentro da região polimórfica de L1 do genoma do HPV. Sondas oligonucleotídicas fluorescentes ligam-se a regiões polimórficas dentro da sequência definida por esses *primers*.

A FDA aprovou este método em Abril de 2011, e este produto tem marcação CE-IVD.

O teste baseia-se em dois processos principais, a preparação das amostras e extracção de DNA, e a amplificação por PCR em tempo real de sequências do DNA alvo. Faz isto utilizando pares de *primers* que são complementares de DNA e da β -globina, e usa detecção em tempo real das sondas de detecção oligonucleotídicas específicas para o DNA

e β -globina marcadas com corante fluorescente e clivadas. A monitorização do teste é feita durante todo o processamento, sendo a extracção, amplificação e detecção do HPV alvo e da β -globina realizadas simultaneamente.

A detecção do DNA amplificado é realizada durante o ciclo térmico através da utilização de sondas oligonucleotídicas marcadas com 4 corantes fluorescentes diferentes. Os sinais amplificados dos 12 tipos do grupo dos outros HR-HPV são detectados com o mesmo corante fluorescente. Enquanto os sinais de HPV-16, do HPV-18 e da β -globina são cada um detectados com o seu próprio corante específico.

Cervista® HPV 16/18

É um teste de diagnóstico *in vitro* para a detecção qualitativa de DNA de 14 tipos de HPV de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68. Faz genotipagem numa segunda reacção, mediante a utilização de outro *kit* é possível a genotipagem parcial dos genótipos HPV-16 e HPV-18. Todavia, na presença de um resultado positivo para HPV de alto risco, e posteriormente também positivo para um destes genótipos, não é possível saber que a positividade se deve apenas aos genótipos 16 ou 18 ou se eventualmente ainda estará presente um mais tipos dos restantes 12 genótipos de alto risco.

O Cervista® HPV 16/18 foi aprovado em 2009 pela FDA oferecendo em relação à *digene*® HC2 HPV DNA a detecção de mais um subtipo vírico, o HPV-66. A inclusão de um controlo interno de DNA prometia reduzir os falsos negativos.

O teste Cervista® HPV 16/18 utiliza a química Invader®, um método de amplificação de sinal para detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos. Este método usa dois tipos de reacções isotérmicas, a primeira ocorre na sequência de DNA alvo e a reacção secundária que produz um sinal fluorescente.

Cada par de sondas oligonucleotídeos liga-se *upstream* e *downstream* ao alvo, criando uma sobreposição (espécie de uma aba) para clivagem através da enzima cleavase (Hologic®). A tal “aba” forma uma estrutura terciária de DNA com energia de ressonância fluorescente. A cleavase liberta um sinal quantificável de fluorescência. O ensaio em 3 *pools* de oligonucleotídeos separados para os tipos de HR-HPV.

O teste Cervista® HPV 16/18 inclui um controlo interno que determina a quantidade relativa de amostra de DNA em cada reacção. O controlo interno, a HIST2H2BE humana, é medido por um sinal fluorescente vermelho, esta medida serve como mecanismo de controlo de qualidade para confirmar que um resultado negativo não se deve a uma amostra insuficiente. Este controlo interno serve também como um medidor interno de processamento que assegura que o procedimento está a ser correctamente desempenhado. O Cervista® HPV 16/18 demonstra hibridização cruzada de por HPV-31.

APTIMA® HPV

O APTIMA® HPV é um ensaio de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro* para a detecção qualitativa de RNAm das proteínas virais E6/E7 de 14 tipos de HR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, e 68).

O ensaio de APTIMA® HPV está aprovado pela FDA para testar mulheres de 21 anos ou mais com citologias com ASCUS, e para rastrear mulheres com 30 anos ou mais como teste coadjuvante da CCV. (Heideman D. 2013) Este teste possui também marcação CE-IVD.

O teste fornece resultados claros positivos, negativos ou inválidos e não faz discriminação entre os 14 tipos detectados.

A metodologia do APTIMA® HPV consiste em 3 etapas principais: captação do alvo, amplificação do alvo, mediada por transcrição (transcriptional mediated amplification-TMA) e detecção dos produtos de amplificação pelo ensaio de hibridização (Hybridization Protection Assay, HPA).

As amostras são transferidas para um tubo que contém um meio de transporte da amostra (specimen transport media - STM) que faz a lise das células libertando o RNAm e o protege da degradação durante a conservação.

Quando o ensaio é realizado, o RNAm alvo é isolado da amostra através da utilização de oligómeros que estão ligados a micropartículas magnéticas. Os oligómeros de captação contêm sequências complementares para regiões específicas das moléculas alvo do RNAm do HPV.

Durante a hibridização, as regiões específicas das sequências dos oligómeros de captação ligam-se a regiões específicas das moléculas alvo do RNAm do HPV. O complexo do oligómero de captação-alvo é captado e retirado da solução.

Terminada a captação do alvo, o RNAm do HPV é amplificado por TMA, que é um sistema de amplificação que utiliza duas enzimas para efectuar o processo de transcrição. Uma das enzimas é a transcriptase reversa que cria uma cópia de DNA (ds) da sequência alvo do RNAm, contendo uma sequência promotora para a polimerase do RNA. A outra enzima a RNA polimerase que produz milhares de cópias da sequência a partir do modelo de DNA de cadeia dupla.

Cada fragmento amplificado serve como um novo alvo para a transcriptase reversa e o processo repete-se automaticamente, resultando na amplificação exponencial.

A detecção do produto de amplificação é feita através da HPA, utilizando sondas de DNA(ss) marcadas por quimioluminescência que são complementares ao produto de amplificação. As sondas marcadas são hibridadas especificamente no produto de

amplificação. Através de um reagente próprio são diferenciadas as sondas hibridadas das não hibridadas. A luz emitida pelos híbridos RNA-DNA é medida num fotómetro em RLU. RLU. Não possui controlo interno da amostra mas apenas da reacção, uma vez que este é adicionado durante o processo.

digene® HC2 HPV DNA

O ensaio de captura híbrida original (HC1) foi aprovado pela FDA em 1995 para uso clínico. A *digene*® desenvolveu a segunda versão (*digene*® HC2 HPV DNA) que também foi aprovada pela FDA em 1999. A *digene*® HC2 HPV DNA continua a ser o actual *gold standard* em diagnóstico de HPV, e é o ensaio mais utilizado em todo o mundo mostrando uma grande reprodutibilidade numa enorme quantidade de estudos. (K. 2010)

Foi através deste teste que se mostrou desde a década passada a existência de infecções de alto risco em tecidos aparentemente normais e a existência de infecções silenciosas que são responsáveis pela conservação do HPV na população em geral. (K. 2010)

Este ensaio consiste na hibridização, em solução, de sondas de RNA complementares às sequências genómicas de DNA de 13 tipos de HPV. É uma hibridização de ácidos nucleicos *in vitro*, em que são capturados híbridos de RNA-DNA à superfície da microplaca e é feita a detecção por um anticorpo monoclonal específico e um substrato quimioluminescente. (Corporation 2004)

A *digene*® HC2 HPV DNA detecta apenas a presença ou ausência de vírus determinando uma medida semi-qualitativa da carga viral. Detecta os seguintes tipos: -16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68. (Corporation 2004; K. 2010)

Os resultados deste ensaio são expressos em unidades de luz relativa (*relative light unit*, RLU). A quimioluminescência das amostras é comparada com a dos controlos positivos (RLU/PC) e é avaliada a carga viral. Uma medição de RLU igual ou maior do que o valor do *cut-off* indica a presença de sequências de DNA de HR-HPV na amostra. Uma medição de RLU mais baixa do que o *cut-off* indica a ausência de sequências de DNA de HR-HPV ou níveis de DNA abaixo do limite de detecção do ensaio. (Corporation 2004)

O *digene*® HC2 HPV DNA é uma técnica que pode ser facilmente aplicada em laboratório pois não exige instalações muito específicas, sendo um teste com baixo risco de contaminação. (K. 2010)

Este ensaio não permitir identificar o genótipo viral mas apenas dizer se está ou não presente, e torna-se menos sensível que a técnica de PCR devido ao limite de detecção de 5000 cópias. Esta aparente desvantagem torna o teste mais adequado à prática clínica.

A limitação, é a falta de controlo interno da amostra e o excesso de falsos positivos para alto risco devido à hibridização cruzada com tipos de baixo risco. (M. 2008; K. 2010)

Utilizam-se os híbridos RNA-DNA para prevenir a hibridização não específica, sendo que, ao utilizar sondas RNA de cadeia simples se evitam reacções cruzadas não desejáveis.

Este teste só detecta HR-HPV por isso outros LR-HPV podem estar presentes na amostra mesmo com resultado negativo. Existe possibilidade de hibridização cruzada entre tipos de LR-HPV, especialmente os tipos de HPV-6 e -42, e as sondas de HR-HPV do ensaio. E assim, amostras com cargas virais de LR-HPV podem ser positivas. (Corporation 2004)

LINEAR ARRAY® HPV

O teste de genotipagem LINEAR ARRAY® HPV é um teste qualitativo *in vitro* para detecção e genotipagem de HPV em amostras clínicas. É um ensaio com sistema *line blot*.

O teste utiliza a amplificação do DNA alvo através de PCR e a hibridização de ácidos nucleicos e detecta 37 genótipos de DNA anogenital de HPV em células cervicais colhidas em solução.

Estes subtipos são: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 e CP6108.

Este ensaio possui uma capacidade superior de detecção de DNA de HPV e subtipos individuais. Possui também uma óptima capacidade de detectar genótipos de HPV presentes numa infecção múltipla, o que pode acontecer em cerca de 35% das amostras. Utiliza concentrações de *primers* que minimizam a competitividade devido à co-amplificação. Amplifica uma região (450pb) no gene L1 do HPV utilizando uma *pool* de *primers* PGMY biotinilados. Este teste incorpora a amplificação de uma região da α -globina como controlo interno.

A interpretação final é feita através de uma guia de referência. A tira que diz respeito à amostra que se quer analisar é colocada nessa guia, que faz ligação da cor apresentada na tira ao subtipo de HPV presente na amostra.

Biopatologia do CCU

A carcinogénese é o processo de formação de uma neoplasia. Compreende habitualmente um processo lento, que pode levar anos até à formação do tumor.

A carcinogénese baseia-se na transformação de uma célula normal numa célula maligna, processo que ocorre após alterações genéticas subsequentes, às quais a célula é sujeita ao longo da vida. (R. 2011)

Foi proposto, já há cerca de uma década, um conjunto de *hallmarks* do cancro adquiridos durante a carcinogénese, com o objectivo de constituir um princípio de organização para compreender a complexidade da doença neoplásica. (R. 2011)

Os *hallmarks* abrangem seis capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento *multistep* dos tumores, e apresentadas na figura seguinte.

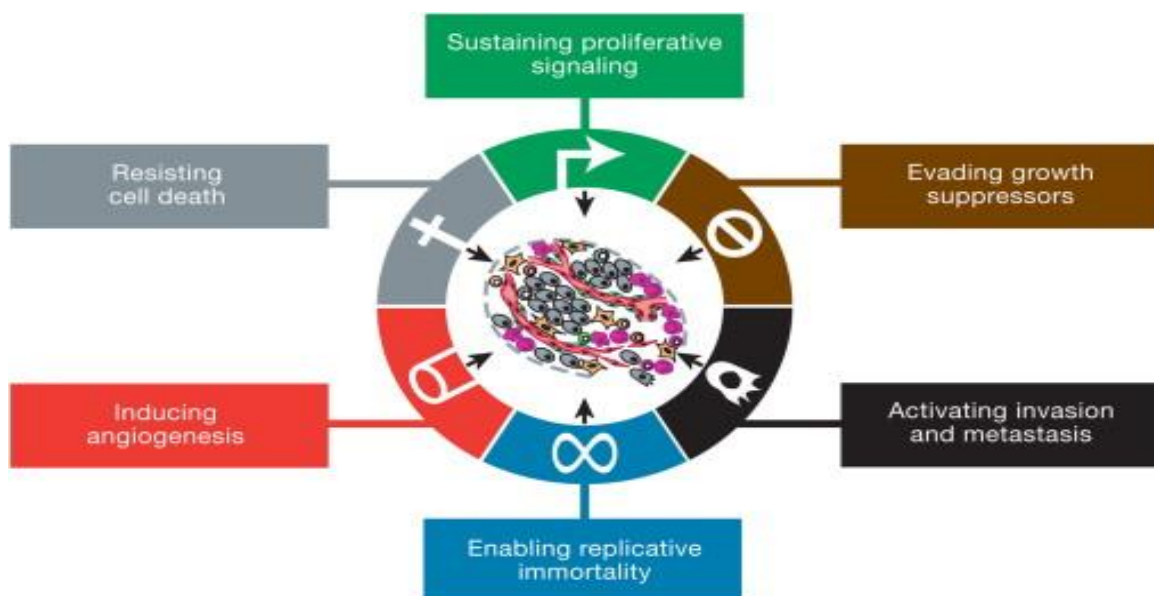


Fig.9 Os *hallmarks* do cancro – esta ilustração apresenta as 6 capacidades biológicas apresentadas em 2000. Durante a última década foi possível testemunhar um progresso notável na compreensão dos mecanismos base de cada *hallmark*.(R. 2011)

Os *hallmarks* são:

- Fuga à apoptose – há sobrevivência de células com erros de DNA por resistência à morte celular geneticamente programada. A apoptose pode ser despoletada por sobreexpressão de um oncogene, o que idealmente levaria à eliminação das células mutadas mas no cancro as células conseguem evadir a apoptose.
- Crescimento e proliferação autónoma - há uma proliferação que é independente de estímulos mitogénicos. As células cancerígenas não necessitam de estimulação por sinais externos (na forma de factores de crescimento) para se multiplicarem.
- Insensibilidade aos factores inibidores de crescimento - as células tumorais prosseguem a sua proliferação ignorando factores inibitórios extra e intracelulares. A proteína retinoblastoma (pRb) previne, nas células normais, a transição inapropriada de G1 para S. Se a pRb está alterada através de uma mutação ou por interferência de HPV, as células podem dividir-se sem controlo o que leva a CCU.
- Imortalidade celular - capacidade replicativa ilimitada através da reactivação da telomerase. As células não cancerígenas morrem após um certo numero de divisões. As células cancerígenas escapam a este limite e são capazes de aparente crescimento e divisões indefinidos. Mas estas células imortais têm cromossomas danificados que podem tornar as células cancerosas.
- Angiogénese – é o processo através do qual novos vasos sanguíneos são formados. As células cancerígenas são capazes de iniciar este processo através da produção de factores de crescimento que estimulem esta nova formação de vasos, assegurando que as células recebam aporte contínuo de oxigénio e outros nutrientes, nutrindo o tumor e permitindo assim a sua progressão.
- Invasão tecidual e metastização – as células cancerígenas conseguem sair do órgão de origem e invadir tecidos adjacentes, através da aquisição de capacidade de mobilização, penetração e emigração, conseguindo também metastizar para partes do corpo distantes.

A acumulação de sucessivas alterações genéticas, citogenéticas e epigenéticas está relacionada intimamente com as alterações citológicas e histológicas observadas, iniciadas por leves displasias e terminando com evolução para CIS e carcinomas invasores.

O ciclo celular é fulcral para compreender a biopatologia do CCU, visto que a maior parte dos erros moleculares que determinam o comportamento anormal das células neoplásicas se baseiam em alterações no ciclo celular

Ciclo celular

O ciclo celular ocorre na generalidade das células e envolve a replicação de DNA, divisão da célula (núcleo e citoplasma) e no final resultam duas células filhas.

São duas as etapas principais que constituem o ciclo celular, a mitose durante a qual ocorre a divisão da célula com divisão nuclear e citocinese, e a interfase, que é o período entre as mitoses onde há síntese e replicação de DNA.

O ciclo celular é constituído por 4 fases: fase G1 (pré-síntese), fase S, fase G2 (pós-síntese) e fase M. Da interfase fazem parte as fases G1, S e G2. O material genético da célula é replicado na fase S (síntese de DNA). A fase M envolve a divisão da célula para produzir duas células filhas e inclui mitose e citocinese. As fases G1 e G2 são *gaps* que antecedem as fases S e M, durante as quais a célula se prepara para a fase seguinte. Na fase G1 ocorre produção de RNA e proteínas necessárias para as fases seguintes. Na fase S existe replicação do DNA nuclear. E na fase G2, nova produção de proteínas, agora para a mitose. A fase M é a fase da mitose na qual ocorre separação dos cromátídeos duplicados e há mitose e citocinese. (Munger K. 2004)

A grande maioria das células encontra-se numa fase de repouso, quiascente em G0 ou numa fase pré-síntese (G1).

Existe todo um conjunto de sinais e mecanismos intra e extracelulares que são responsáveis pela coordenação dos processos que ocorrem durante o ciclo celular. Estes fazem com que haja progressão do ciclo celular mas podem influenciar a sua activação ou inibição. Existem pontos específicos para ser realizado este controlo denominados *checkpoints*. Um *checkpoint* essencial é o que ocorre da fase G1 para a fase S pois permite a detecção de erros no DNA antes de este ser replicado. Caso tenha sido detectado um erro o ciclo celular é interrompido de forma a serem reparados os genes envolvidos. (Munger K. 2004)

O *checkpoint* antes da fase M evita que a mitose ocorra sem ter havido replicação completa do DNA, e detecta também erros de DNA. Existe ainda outro *checkpoint* durante a mitose para assegurar que os cromátídeos são distribuídos devidamente.

Inibidores das cinases dependentes das ciclinas

O controlo do ciclo celular é regulado por complexos ciclina/cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e por inibidores das CDKs.

Estas proteínas participam de várias formas no ciclo celular inibindo a sua

progressão. Estas proteínas pertencem a duas famílias diferentes: a família Cip/Kip e a família INK4/ARF. Da família Cip/Kip fazem parte a p21, p27 e a p57 que possuem regiões de ligação às CDK e ciclinas. Regulam várias fases do ciclo celular particularmente G1 e S, através da inibição das CDK 2, 4 e 6 com as ciclinas A, E e D. Da família INK4/ARF fazem parte o p16, p15, p19 com repetições tandem. Estes apenas actuam no ponto de restrição do ciclo celular, no final da fase G1, inibindo o complexo das CDK4/6 - ciclina D. (Munger K. 2004)

Regulação do ciclo celular e papel do p16 no ciclo celular

A proteína p16^{INK4a} tem um papel principal no mecanismo de regulação do ciclo celular. Faz parte do controlo mediado pela pRb de transição entre fase G1 e S, funcionando como um regulador negativo da proliferação celular, inibindo especificamente os complexos CDK4/6-ciclina D e evitando a fosforilação da pRb. (Carozzi F 2008)

Foi demonstrado que o aumento da p16^{INK4a} na presença de pRb normal levava à restrição do ciclo celular. A sua expressão pode ser encontrada mas de uma forma muito baixa durante quase todo o ciclo celular. É possível afirmar que existe algum tipo de alteração na dinâmica da p16^{INK4a} quando os valores da sua expressão são muito elevados ou totalmente ausentes. (Munger K. 2004)

Vários estudos têm vindo a demonstrar que a expressão de p16^{INK4a} é nitidamente influenciada pela expressão de pRb. A existência de sobre-expressão de p16^{INK4a} em células cervicais pode ser compreendida como um indicador da integração do DNA de HPV na célula do hospedeiro. Isto é devido essencialmente à inactivação da pRb pela proteína E7. (Ikenberg H. 2013)

Vários estudos têm vindo, nos últimos anos, a demonstrar um elevado número de casos de HSIL e carcinoma invasor, com uma nítida sobre-expressão de p16^{INK4a}. Está nestes estudos associada a presença de p16^{INK4a} sobre-expresso a um aumento da gravidade da lesão. (Ikenberg H. 2013)

A imunocitoquímica com marcação por p16^{INK4a}, tem o potencial para fornecer uma elevada sensibilidade na presença de lesões de alto grau, tendo especial interesse como factor uniformizador de avaliação histológica.

Proliferação e ki-67

Define-se proliferação celular como um aumento do número de células decorrente da conclusão do ciclo celular.

A proliferação celular depende de vários factores, como a duração do ciclo celular, da fracção proliferativa (número de células que proliferam), e da fracção de células perdidas por morte ou diferenciação celular.

O cancro está quase sempre associado a hiperproliferação celular, que indica uma desordem no crescimento celular. O crescimento tumoral será tanto maior quanto a fracção de proliferação.

Foram desenvolvidas metodologias para avaliar e estudar a proliferação oncológica.

A proteína ki-67 é uma proteína associada à proliferação, e que é detectada apenas nos núcleos de células em proliferação. Obviamente está presente em todas as fases do ciclo celular, menos na fase quiascente G0. No entanto, em conjunto com a observação da presença de outra proteína pode ser muito informativa. Isto é, as células com sobre-expressão de proteína p16^{INK4a} só podem proliferar activamente se o seu sistema de controlo do ciclo celular estiver alterado, por isso a expressão simultânea de p16^{INK4a} e do marcador de proliferação ki-67 na mesma célula não deverá ser possível em condições fisiológicas normais. Logo, a expressão simultânea de ki-67 e p16^{INK4a} deve ser considerada um indicador de desregulação do ciclo celular e consequente transformação celular. (Munger K. 2004)

Método para avaliação de desregulação do ciclo celular – CINtec® PLUS

O método CINtec® PLUS é um teste de imunocitoquímica para a detecção qualitativa e simultânea das proteínas p16^{INK4a} e Ki-67. O *kit* CINtec® PLUS, composto por 2 anticorpos, foi criado de forma a realizar uma coloração em dois tempos das citologias ginecológicas. Possui um anticorpo monoclonal de rato dirigido à proteína p16^{INK4a} humana e um anticorpo monoclonal de coelho dirigido à proteína humana ki-67. (AG 2009; Schmidt D. 2011)

Tem como objectivo melhorar a sensibilidade e especificidade para a detecção de displasia de alto grau.

Actualmente, os testes de HR-HPV são utilizados para efectuar triagem de mulheres com ASC para colposcopia. No entanto, para os casos de LSIL não existe uma triagem disponível com boa relação custos-qualidade e eficácia. (Petry U. 2011; Schmidt D. 2011)

A técnica de imunocitoquímica para avaliar a sobreexpressão da p16^{INK4a} (proteína reguladora do ciclo celular) tem vindo a ser demonstrada como uma abordagem possível para fazer a triagem para colposcopia para mulheres com ASCUS ou LSIL. Em alguns estudos o p16^{INK4a} fornecia taxas de sensibilidade, para a detecção de CIN2+ subjacente, que são parecidas com as taxas de sensibilidade do teste HPV. (Denton K 2010; Schmidt D. 2011; Loghavi S. 2012)

Ao mesmo tempo, a especificidade da citologia com p16^{INK4a} mostrou ser substancialmente mais elevada do que a especificidade do teste de HPV em vários estudos. Esta observação foi ainda mais relevante em mulheres mais novas que 30 anos, devido as elevadas taxas de prevalência de infecção por HPV em grupos mais jovens. Como tanto a sensibilidade como a especificidade são medidas relevantes na avaliação da *performance* dos testes usados para triagem de ASCUS e LSIL, é importante implementar algoritmos de triagem que forneçam o mais elevado nível de especificidade sem sacrificar a sensibilidade. (Denton K 2010; Ikenberg H. 2013)

Tem sido demonstrada a associação da sobreexpressão de p16^{INK4a} em displasias cervicais, com a actividade transformadora da oncoproteína E7 de HR-HPV. Esta sobreexpressão p16^{INK4a} pode ser considerada como um marcador da inactivação da função supressora-tumoral da pRb mediada por E7. (Schmidt D. 2011; Ikenberg H. 2013)

Esta informação representa a evidência experimental que a sobreexpressão de p16^{INK4a} é induzida pelo cancelamento do mecanismo de *feedback* negativo que é mediado pela pRb em condições fisiológicas normais. A inactivação funcional de pRb pode levar a

instabilidade genómica e consequentemente a transformação maligna (isto quando a inactivação ocorre em células responsáveis pela replicação de DNA). Portanto a detecção simultânea da sobreexpressão de p16^{INK4a} e da expressão do marcador de proliferação ki-67 na mesma célula cervical, indica desregulação do ciclo celular. (Petry U. 2011; Schmidt D. 2011; Ikenberg H. 2013)

Em situações fisiológicas normais, a expressão simultânea de uma proteína com função supressora tumoral (p16^{INK4a}) e de um marcador de proliferação (como o ki-67) deviam excluir-se mutuamente. Assim sendo, é possível usar a detecção da co-expressão de p16/ki-67 por imunocitoquímica para identificar células com ciclo celular desregulado, independentemente dos parâmetros de interpretação baseados na morfologia. (Petry U. 2011; Schmidt D. 2011; Loghavi S. 2012)

A presença de uma ou mais células com dupla marcação pode ser utilizada como indicador de um CIN subjacente, especialmente de graus mais severos (CIN2+). (Ikenberg H. 2013)

Objectivos

Objectivo Geral

Determinar se a combinação dos marcadores p16^{INK4a} /ki-67 como novo método de diagnóstico de lesões cervicais de baixo grau, poderá contribuir para uma avaliação de risco imediato de CIN2+ num grupo de doentes evitando a colposcopia imediata nos casos CINtec® PLUS negativos.

Objectivos Específicos

- 1) Comparar as metodologias de detecção de HPV (Abbott RealTime HR HPV, cobas® HPV®, Cervista® HPV 16/18 , APTIMA® HPV e *digene*® HC2 HPV DNA) e o CINtec® PLUS em termos de concordância entre testes.
- 2) Avaliar a especificidade e sensibilidade na identificação de CIN2+ com CINtec® PLUS
- 3) Avaliar a especificidade e sensibilidade na identificação de CIN2+ com a detecção de DNA de HPV de alto risco por métodos de Biologia Molecular
- 4) Avaliar se o CINtec® PLUS é um melhor preditor de risco de lesão do que os outros testes estudados? O que acresce o teste de CINtec® PLUS?
- 5) Verificar a existência de uma correlação da análise citológica da quantidade de células positivas para CINtec® PLUS, com da gravidade da lesão. Haverá uma relação proporcional?
- 6) Avaliar a intervenção dos ginecologistas na utilização das *guidelines* da ASCCP

Material e métodos

Inicialmente, foi feita uma revisão da literatura sobre este tema, para facilitar a selecção do objecto concreto da análise, e ser possível definir os objectivos geral e específicos do estudo.

Foram definidas etapas e objectivos, com prazo estabelecido de forma a fasear todo o trabalho. Foi realizada uma avaliação dos registos clínicos, estudada a história clínica de cada paciente e feita a análise geral dos resultados obtidos em cada uma das metodologias que se propôs estudar.

Para a citologia foram levantadas 100 lâminas de baixo grau e reavaliadas; posteriormente foi realizado o CINtec® PLUS nessas mesmas lâminas.

A análise biomolecular consistiu na realização de um grupo de exames de detecção de HPV de alto risco e genotipagem parcial, entre as quais Abbott RealTime HR HPV, cobas® HPV, Cervista® HPV 16/18, APTIMA® HPV, *digene*® HC2 HPV DNA e por fim em casos discordantes utilizou-se o LINEAR ARRAY® HPV.

O plano de estudo resume-se no seguinte fluxograma.

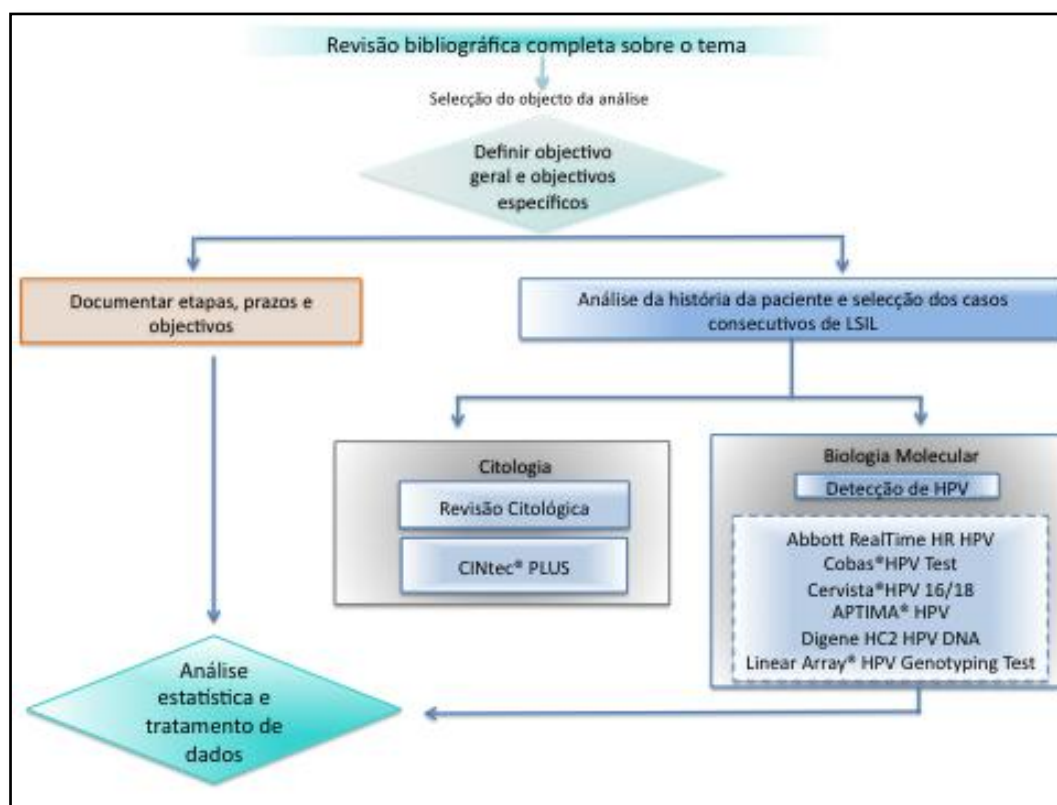


Fig.10 Fluxograma do Plano de Estudo

População em estudo

Este projecto é um estudo observacional, já que não existe qualquer manipulação de intervenções directas sobre os indivíduos em estudo. Foi apenas realizada a observação dos pacientes e das suas características. É um estudo longitudinal, pelo que existiu um período de seguimento iniciado em 2011 e que terminou em Agosto de 2013. Os dados foram colhidos aquando da amostra inicial e ao longo dos dois anos consequentes, pelo que se trata de um estudo prospectivo de *coorte* que foi realizado em amostras residuais de 100 citologias cérvico-vaginais em meio líquido PreservCyt®.

A amostra foi constituída por citologias de 100 mulheres com lesão de baixo grau (LSIL) descrita em citologia ginecológica pelo sistema de classificação Bethesda. A selecção desta população foi sequencial, tendo sido escolhidos casos consecutivos de citologia interpretada como LSIL do arquivo do L.A.P. - Laboratório de Anatomia Patologia, Lda - Dra. Conceição Saldanha e Prof. Vicente Gonçalves.

Foi feito o levantamento das 100 lâminas de ThinPrep® que, embora já tenham sido avaliadas por dois observadores (Citotécnico e Citopatologista), foram reavaliadas exaustivamente, fotografadas, e marcados campos importantes para futura comparação com imunocitoquímica.

Os critérios de inclusão foram os seguintes: indivíduos do sexo feminino que apresentavam citologia cérvico-vaginal com interpretação de LSIL (de acordo com Classificação de Bethesda) e presença de células viáveis na mesma amostra de Thinprep® para realização de pesquisa de DNA do HPV e CINtec® PLUS.

Não foi possível realizar para a totalidade das amostras todos os testes previstos por falta de volume residual. Foram excluídas do estudo 3 amostras para cálculos que analisem ou envolvam as tecnologias que não foi possível executar.

Foram verificadas algumas limitações que podem condicionar a qualidade dos casos e obviamente dos dados estatísticos. O CINtec® PLUS foi efectuado nas lâminas originais de interpretação de LSIL, sendo necessário remover a lamela, o que pode ter originado descolamento e portanto perda de alguns grupos celulares, o que pode afectar o resultado do CINtec® PLUS. Em alguns casos o CINtec® PLUS foi feito novamente e para isso foram efectuadas novas lâminas com material residual. O facto de a mesma amostra ter sido utilizada para a realização de todos os testes fez com que esta fosse perdendo representatividade celular. Consequentemente a contagem de células positivas nos casos de CINtec® PLUS positivos apresentam uma ordem de grandeza imprevisível, e muito

provavelmente diferente dos valores que poderiam ser obtidos na amostra intacta, ou na lâmina sem descolamento de grupos celulares.

As amostras foram todas colhidas em 2011, e a metodologia de CINtec® PLUS foi apenas efectuada em 2012, pelo que a idade da amostra pode também fazer variar os resultados. Os resultados da imunocitoquímica estão intimamente ligados à qualidade das células coradas.

Após aplicação dos critérios o conjunto final de resultados alberga um grupo de 97 mulheres com idades compreendidas entre 20 e 67 anos.

Procedimentos laboratoriais – especificações técnicas

Citologia – reavaliação

Foram levantadas do arquivo todas as lâminas respeitantes às 100 mulheres avaliadas. Todos os casos foram revistos por um observador. A interpretação de LSIL manteve-se em todos os casos.

As lâminas foram fotografadas, e marcadas com caneta de ponta de diamante. As fotografias foram tiradas a grupos celulares mais suspeitos e a grupos celulares que evidenciam o diagnóstico proposto, para futura comparação com células marcadas após imunocitoquímica.

CINtec® PLUS

O CINtec® PLUS foi efectuado nas lâminas originais de interpretação de LSIL sendo que todas elas são lâminas de citologia líquida ThinPrep® previamente coradas.

Foi necessário remover as lamelas com xilol de acordo com o protocolo para CINtec® PLUS (incubar lâminas até lamela se soltar, seguidamente colocar lâminas em xilol novo durante 15 minutos e hidratá-la). O facto de ter sido necessário remover a lamela e descorar a lâmina fez com que se perdessem, por descolamento, alguns grupos celulares, o que faz com que o resultado final da classificação de CINtec® PLUS possa sofrer algum enviesamento.

O método CINtec® PLUS é um teste de imunocitoquímica para a detecção qualitativa e simultânea das proteínas p16^{INK4a} e Ki-67. O *kit* CINtec® PLUS, composto por 2 anticorpos, foi criado de forma a realizar uma coloração em dois tempos das citologias ginecológicas. Possui um anticorpo monoclonal de rato, dirigido à proteína p16^{INK4a} humana e um anticorpo monoclonal de coelho, dirigido à proteína humana ki-67.

Foram divididas as amostras em séries de 10-30 amostras. Em cada série foi usada uma lâmina de controlo positivo (amostra de HSIL), estas foram preparadas a fresco todos os dias, para serem utilizadas em cada corrida. O controlo negativo é a própria amostra;

todas as amostras apresentam células marcadas com p16^{INK4a} e ki-67 isolados, demonstram proliferação celular e os polimorfonucleares marcam com ki-67.

As amostras foram processadas manualmente utilizando Shandon Coverplate™ Sequenza™ Immunostaining System da Thermo Scientific™ Shandon™.

A técnica iniciou-se com a recuperação antigénica (HIER – Heat Induced Epitope Retrieval) que foi feita em banho-maria (10 minutos a 95º- 99º C), e para a qual foi usada a solução de recuperação antigénica fornecida com o *kit*, seguindo o método de preparação indicado na bula.

Após a recuperação antigénica, as lâminas tiveram de arrefecer e só depois puderam ser colocadas nas *coverplates* para encaixar no sistema Sequenza™. Foi realizada a técnica de imunocitoquímica de acordo com a bula, após a preparação dos reagentes necessários. A coloração foi efectuada em 20 passos que incluíram: bloqueio da peroxidase endógena, incubação com solução de anticorpos primários p16^{INK4a} e ki-67, incubação com reagentes de visualização, e por fim com os cromogénios DAB e Fast Red.

O cocktail de anticorpos é composto por um anticorpo monoclonal de ratinho anti p16^{INK4a} (clone E6H4™) e um anticorpo monoclonal de coelho anti Ki-67 (Clone 274-11 AC3) e vem num tampão Tris 50mM a pH 7.2, contendo 15 mmol/L de Azida de sódio (NaN3) e uma proteína estabilizante.

Quando terminada a coloração, as lâminas são retiradas dos *coverplates* e contrastadas com hematoxilina aquosa (é essencial a hematoxilina ser não alcoólica devido à instabilidade do Fast Red em soluções alcoólicas). A diferenciação é feita com água corrente. Entre todos os passos há lavagens feitas com solução tampão, preparada antes de iniciar a técnica, cerca de 2 mL são distribuídos ao longo da lâmina para serem feitas as lavagens. O volume de anticorpos e outros reagentes é de 200 µL em cada lâmina.

Por fim, a montagem contempla duas fases. A primeira aquosa, com um produto de montagem fornecido no *kit* que necessita de secar ao ar ou 1 hora de estufa até 60°C. Só depois é feita segunda fase - a montagem definitiva, mergulhando as lâminas em xilol e depois montando-as com um meio de montagem convencional à base de xilol (entellan).

Avaliação dos imunomarcadores

As reacções cromogénicas são obtidas com cromogénio DAB (para a p16^{INK4a}) e com Fast Red (para o ki-67).

A avaliação dos resultados do CINtec® PLUS foi feita por dois observadores

independentes, dois citotécnicos e exaustivamente descrita e fotografada.

A interpretação foi posteriormente discutida e comparada com a da Dra. Monika Wolff (Technical Application Specialist Senior CINtec) pioneira no projecto CINtec® PLUS e que antes das reuniões de trabalho teve acesso a todas as lâminas para a sua observação atempada e minuciosa.

Os casos discordantes foram ainda revistos por citopatologista e discutidos entre todos.

A metodologia CINtec® PLUS dá dois produtos de reacção diferentes: um precipitado castanho no núcleo e/ou citoplasma aparece em células que sobreexpressam p16^{INK4a}, e um precipitado vermelho no núcleo revela expressão de Ki-67. A presença da marcação simultânea (co-localização de marcação castanha no citoplasma e vermelha no núcleo) na mesma célula é definida como CINtec® PLUS positiva. Nos casos em que não exista marcação, ou esta não seja simultânea na mesma célula é classificada como CINtec® PLUS negativa.

As lâminas foram avaliadas como positivas, negativas ou inconclusivas. E nos casos positivos foi ainda realizada uma contagem de células positivas (tendo em conta o número de células por lâmina referido por Bethesda). As directrizes do Sistema de Bethesda dizem que 5000 células escamosas bem conservadas são requeridas para uma avaliação satisfatória (cerca de 50 a 60 células por campo 10x). Só foram contabilizadas como células positivas, células com limites celulares bem definidos, células preservadas e com marcação evidente e inequívoca. A contagem foi realizada em toda a lâmina para o número total de células (valores para uma média de 5000 por lâmina). A interpretação foi feita de acordo com o fabricante, a técnica defende que basta uma célula para o caso ser positivo mas será que maior número de células positivas esta associado a maior lesão? Os HSIL utilizados como controlos tinham muitas células marcadas.

Foram repetidas 23 lâminas (casos: 2, 3, 5, 8, 15, 16, 18, 21, 23, 24, 42, 54, 57, 59, 66, 67, 71, 74, 76, 77, 81, 87, 96) por serem de leitura dúbia, e terem falhado controlos internos. Para estes casos foi feita uma nova lâmina com o volume residual da amostra. E foram novamente utilizados, como controlo, casos de HSIL.

Abbott RealTime HR-HPV

É um ensaio de PCR (polymerase chain reaction) em tempo real qualitativo in vitro que faz detecção de genótipos do vírus de HPV, utilizando uma amplificação de DNA alvo e tecnologia de detecção de DNA de HPV de alto risco em células cervicais de colheitas em meio líquido. (Cuzick J. 2010; Laboratories 2010)

Foi separada uma alíquota de 1mL (sendo que o *input volume* necessário é apenas 400µL) para cada amostra do estudo.

O processamento é automático sendo que apenas foi necessário colocar no equipamento m2000 todas as amostras, e os reagentes necessários à extracção e amplificação. Para controlo interno foi utilizada a detecção de uma sequência de β-globina humana endógena da amostra, para controlo de validação da amostra para a sua adequabilidade celular, extracção de amostra e eficiência da amplificação. Foram também utilizados um controlo negativo e um controlo positivo como controlos externos.

É sempre analisado um controlo negativo e um positivo, para se certificar que o processamento, amplificação e detecção da amostra são correctamente efectuados. Estes controlos são processados no mesmo ensaio com as outras amostras.

O controlo negativo apenas contém uma sequência do controlo interno e espera-se como único sinal o controlo interno no canal cy5.

O controlo positivo contém DNA com sequências de HPV-16, -18, -58 e controlo interno, por isso neste espera-se 4 sinais: VIC para o HPV-16, NED para o HPV-18, FAM para o HPV- 58 e cy5 para o controlo interno.

O controlo negativo serve essencialmente para verificar que não ocorreu contaminação. O sinal do controlo interno serve para confirmar que cada amostra recebeu o número de células suficientes para a detecção exacta do HR-HPV e que foi processada correctamente, e também para indicar se estão presentes inibidores da amplificação.

No final, os resultados foram apresentados da seguinte forma: positivo para HPV-16, positivo para HPV-18, positivo para o grupo de 12 tipos de HR-HPV, combinação de infecção múltipla entre estes ou resultado negativo.

Utilizou-se, como aconselhado no *package insert*, uma zona apenas para amplificação e detecção dos produtos amplificados e outra separada para preparação de reagentes. (Laboratories 2010)

cobas® HPV

É um teste qualitativo *in vitro* que utiliza amplificação de DNA alvo através de PCR em tempo real e simultânea hibridização de ácidos nucleicos para detecção de 14 genótipos de HR-HPV, fazendo genotipagem parcial dos subtipos HPV-16, -18 e outros HR-HPV.

Tal como o sistema anterior, este é também automatizado, e para realizar este estudo foi apenas necessário uma alíquota da amostra em causa e todos os outros reagentes faziam parte do *kit*. Foram então separadas alíquotas de cada uma das amostras do estudo, e a máquina foi abastecida com todos os reagentes necessários à reacção, pontas de pipetas, placas de reacção e de PCR, e os reagentes a MasterMix, Magnésio e os controlos positivos e negativo.

A preparação de amostras para o teste cobas® HPV é automatizada com utilização do equipamento cobas x480. As amostras foram digeridas sob condições de desnaturação a temperaturas elevadas e seguidamente deu-se a lise celular, através do reagente de desnaturação

O DNA do HPV é libertado bem como a β -globina que vai servir como controlo. Foram seguidamente purificados através da absorção das partículas magnéticas, lavados e separados das partículas, estando prontos para o passo seguinte de amplificação.

O cobas® HPV utiliza *primers* para definir uma sequência de aproximadamente 200 nucleótidos dentro da região polimórfica de L1 do genoma do HPV. Um grupo de *primers* presente na MasterMix é concebido para amplificar o DNA dos 14 HR-HPV. As sondas oligonucleotídicas fluorescentes ligam-se a regiões polimórficas definidas pelos *primers*.

Foi desnaturado o DNA viral e DNA genómico, para a realização da PCR.

Este teste utiliza tecnologia de PCR em tempo real. Cada sonda oligonucleotídica da reacção está marcada com um corante fluorescente que actua como sinalizador, e com um supressor que extingue as emissões fluorescentes do corante de uma sonda intacta.

À medida que a amplificação progride, as sondas complementares ao produto de amplificação ligam-se a sequências de DNA(ss) específicas e são clivadas pela actividade nuclease da polimerase do DNA. Assim que o corante de sinalização é separado do supressor por esta actividade da nuclease, emite fluorescência. As amplificações são lidas em diferentes comprimentos de onda consoante sejam HPV-16, HPV-18, outros HR-HPV ou controlo da β -globina.

A β -globina humana endógena foi utilizada como controlo interno para avaliar a qualidade da amostra e identificar amostras que contivessem factores de inibição do processo de amplificação. Foram usados dois controlos externos: um positivo e outro negativo.

Cervista® HPV 16/18

O teste Cervista® HPV 16/18 utiliza a química Invader®, um método de amplificação de sinal para detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos. Este método usa dois tipos de reacções isotérmicas, a primeira ocorre na sequência de DNA alvo e a reacção secundária que produz um sinal fluorescente.

Neste trabalho foi utilizada a metodologia automática no equipamento MTA para a qual foi apenas necessário recolher alíquotas das amostras, preparar as soluções e colocar no aparelho todos os reagentes necessários para as reacções.

O teste Cervista® HPV 16/18 inclui um controlo interno que determina a quantidade relativa de amostra de DNA em cada reacção. O controlo interno, a HIST2H2BE humana, é medido por um sinal fluorescente vermelho. Esta medição serve como mecanismo de controlo de qualidade para confirmar que um resultado negativo não se deve a uma amostra insuficiente. Este controlo interno serve também como um medidor interno de processamento que assegura que o procedimento está a ser correctamente desempenhado.

Foram utilizados dois controlos externos, um positivo e um negativo, caso esses controlos não cumpram os critérios as amostras são todas consideradas inválidas e, consequentemente, o teste seria descartado.

APTIMA® HPV

As amostras foram transferidas para um tubo que contém um meio de transporte da amostra (specimen transport media - STM). Este consiste numa solução tampão de fosfato que contém um detergente e um agente quelante que faz a lise das células libertando o RNAm

Depois da diluição em STM as amostras foram submetidas ao ensaio APTIMA® HPV.

Este ensaio foi desenhado para detectar RNAm de E6/E7 de tipos de HR-HPV,

baseados nas sequências conhecidas destes HR-HPV e nas mutações dessas sequências.

Quando o ensaio é realizado, o RNAm alvo é isolado da amostra através da utilização de oligómeros que estão ligados a micropartículas magnéticas. Os oligómeros de captação contêm sequências complementares para regiões específicas das moléculas alvo do RNAm do HPV.

Cada amostra diluída foi transferida para um tubo de reacção onde foi adicionado o reagente de reacção, que contém oligómeros de captação e micropartículas. Durante a hibridização, as regiões específicas das sequências dos oligómeros de captação ligam-se a regiões específicas das moléculas alvo do RNAm do HPV. O complexo do oligómero de captação-alvo é captado e retirado da solução, empurrando-o para a parede lateral do tubo de reacção graças às micropartículas magnéticas.

Terminada a captação do alvo, o RNAm do HPV é amplificado por TMA, que se baseia em duas enzimas: a transcriptase reversa e a RNA polimerase. A transcriptase reversa gera uma cópia de DNA da sequência alvo que contém uma sequência promotora para a polimerase do RNA. A polimerase de RNA produz múltiplas cópias do RNA amplificado a partir do modelo de DNA.

A amplificação do produto alvo foi conseguida utilizando *primers* que hibridizam regiões conservadas de RNAm de E6/E7.

A cada tubo de reacção foram adicionados 75µL de reagente de amplificação. Os tubos de reacção foram seguidamente transferidos para uma incubadora onde foi realizada a hibridização dos *primers* específicos com o alvo e com o controlo interno.

A detecção quimioluminescente do produto de amplificação foi conseguida através do HPA. O ensaio de protecção de hibridização utiliza éster de acridina (AE), cujas moléculas ficam protegidas dentro da dupla hélice que é formada quando a sonda se liga ao seu alvo específico. Antes de activar a molécula AE, é adicionado um produto químico que destrói as moléculas AE em sondas não hibridizadas. Quando o reagente de detecção é adicionado, somente as sondas hibridizadas (que contém AE) emitem sinal, indicando que o DNA do organismo alvo está presente. O sinal quimioluminescente foi medido num fotómetro e os resultados foram obtidos em forma de RLU.

De forma a prevenir que as áreas de laboratório fiquem contaminadas com o produto de amplificação, estas devem estar dispostas de modo a ter um fluxo de trabalho unidireccional, desde a preparação do reagente até à detecção. As amostras, equipamentos e reagentes não devem sair da área onde foram utilizados. Além disso, os técnicos não devem voltar às áreas de trabalho anteriores sem as devidas medidas de protecção contra contaminação. De acordo com estas normas, foram utilizadas salas separadas para a pré e a pós-amplificação.

digene® HC2 HPV DNA

É um ensaio de hibridização de ácidos nucleicos, com amplificação do sinal, que utiliza a detecção por microplaca quimioluminescente.

As amostras que contêm o DNA alvo hibridizam com uma sonda cocktail de RNA de HPV. Os híbridos resultantes RNA-DNA são capturados à superfície da microplaca coberta com anticorpos específicos para híbridos RNA-DNA. Os híbridos imobilizados reagem depois com os anticorpos, conjugados com fosfatase alcalina, específicos para híbridos RNA-DNA, e detectados com um substrato quimioluminescente.

Vários anticorpos conjugados ligam-se a cada híbrido capturado, resultando na amplificação do sinal. À medida que o substrato é clivado pela ligação de fosfatase alcalina, luz é emitida e medida em RLU num fotómetro. A intensidade da luz medida revela a presença ou ausência de DNA alvo na amostra.

A leitura é automatizada, os valores de RLU são transmitidos para um computador, e o *software* faz a validação do ensaio e quantificação dos controlos positivo e negativo e também das amostras.

As amostras passam por 5 etapas: digestão e desnaturação, hibridização, captura dos híbridos, reacção dos híbridos com o conjugado, e por fim, a reacção com o conjugado e amplificação do sinal.

Foram seguidas as instruções do fabricante e de acordo com o protocolo da bula foi realizada a:

Desnaturação – utilizaram-se 4mL de cada amostra em estudo e estas alíquotas foram submetidas a um reagente de desnaturação que contém hidróxido de sódio e quebra a cadeia dupla de DNA. É necessário cuidado extra neste passo pois se for feito de forma inadequada, a desnaturação pode ser incompleta e resultados falsos positivos podem ocorrer.

Hibridização – uma mistura de 75µL da amostra mais 25µL da sonda cocktail foram pipetados para tubos de hibridização, onde permaneceram durante uma hora a hibridizar.

Captação de híbridos - 100µL dos controlos e amostras são transferidos para a microplaca. Após reagirem durante uma hora rejeita-se o conteúdo dos poços.

Reacção dos híbridos com o conjugado – foi acrescentado a cada amostra o conjugado da enzima fosfatase alcalina: Após 30 minutos de incubação, procede-se a uma lavagem.

Amplificação do sinal – adiciona-se o substrato quimioluminescente e é incubado 15 minutos. Seguidamente a placa é colocada no fotómetro onde é feita a leitura dos RLU. É

feita uma média dos RLU dos controlos positivos e negativos, pelo software, que vai indicar o *cut-off* e validar o ensaio.

LINEAR ARRAY® HPV

Nos casos discordantes foi utilizado o LINEAR ARRAY® HPV para esclarecer algumas dúvidas causadas pelos testes de segunda geração.

É um teste qualitativo *in vitro* que utiliza a amplificação de DNA alvo por PCR e hibridização de ácidos nucleicos. Detecta a sequência de DNA L1 de 37 genótipos de alto e baixo risco.

Foi preparada a PCR com os reagentes fornecidos e de acordo com as instruções do fabricante. A PCR foi realizada com um volume de reacção de 100 µL. Seguidamente ocorre a amplificação. Os produtos amplificados foram hibridizados e detectados com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Após amplificação as amostras são transferidas para o sistema ProfiBlot™, que permitiu a automatização dos passos seguintes desta análise.

Os produtos da amplificação biotinilados gerados são desnaturados e hibridizados com um *array* com sondas imobilizadas para os 37 genótipos.

As tiras de LINEAR ARRAY® HPV foram por fim interpretadas utilizando uma guia de referência fornecida.

Métodos estatísticos

A análise estatística dos resultados foi efectuada utilizando o software Statistical Package for Social Sciences (IBM ®SPSS® Statistics) software versão 21 para Macintosh (Chicago, IL).

Foi calculado o valor de Kappa de Cohen e o valor da significância estatística de McNemar para comparação das metodologias e concordância dos métodos. Foi calculada a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) para todos os métodos, para avaliar a significância estatística desses valores. Foi também feita análise descritiva dos dados, através de distribuição de frequências, e *crosstabs*. Para estudar possíveis associações entre as variáveis, usando testes paramétricos Qui-quadrado (χ^2). O valor de p foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05.

Os resultados obtidos entre as diferentes metodologias analisadas foram comparados através dos valores de concordância do valor de Kappa de Cohen, pelo que para facilitar a interpretação foi criada esta tabela adaptada de Landis & Koch.

Tab.1 O nível de concordância foi determinado utilizando a estatística de Kappa, e associando cores para facilitar a compreensão dos valores apresentados. (Landis J. 1977)

Landis & Koch	Concordância	Cor
0	Sem concordância	
0-0,20	Concordância ligeira	
0,21-0,40	Concordância considerável	
0,41-0,60	Concordância moderada	
0,61-0,80	Concordância substancial	
0,81-1,00	Concordância excelente	

O VPP e VPN foram calculados tendo em conta uma prevalência de 19%. Esta foi calculada para os casos de LSIL descritos com histologia (9 CIN2+/47 total de casos histológicos).

Resultados

Análise de dados

Descrição da base de dados

A informação obtida para cada caso clínico incluiu: o número da amostra, a idade da mulher, o diagnóstico citológico, o diagnóstico histológico e resultado dos exames de biologia molecular (Abbott RealTime HR HPV, cobas® HPV, Cervista®HPV 16/18 APTIMA® HPV, *digene*® HC2 HPV DNA, LINEAR ARRAY® HPV (apenas para alguns casos)), o resultado do teste CINtec® PLUS, o número de células positivas para os resultados de CINtec positivos, o *follow-up* no final de dois anos de estudo da paciente, o número de pacientes cujo ginecologista pediu estudo de HPV no seguimento da lesão de baixo grau, o resultado desse teste, se a paciente foi ou não conizada, e por fim uma avaliação de “doença” no final dos dois anos de *follow-up*.

O atributo “doença *follow up* após 2 anos” consistiu numa interpretação baseada num conjunto de resultados. Isto é, ao passo que na histologia a avaliação é feita no momento dos outros testes com a presença de uma conização ou biópsia, esta avaliação só foi feita no final deste estudo (dados até Setembro de 2013). Assim, foram analisados todos os testes pedidos para cada doente durante dois anos, desde testes de HPV, a mais biópsias e a CCV. Mediante estes resultados foram classificados: 1: sem doença ou \leq CIN1; 2: \geq CIN2; 3: \geq CIN3; 4: sem *follow-up*. Sendo que por exemplo uma paciente que tenha feito durante dois anos dois CCV NILM e dois testes de HPV negativos é considerado um caso sem doença ou \leq CIN1.

A seguinte tabela apresenta uma breve descrição de cada um dos atributos presentes na amostra.

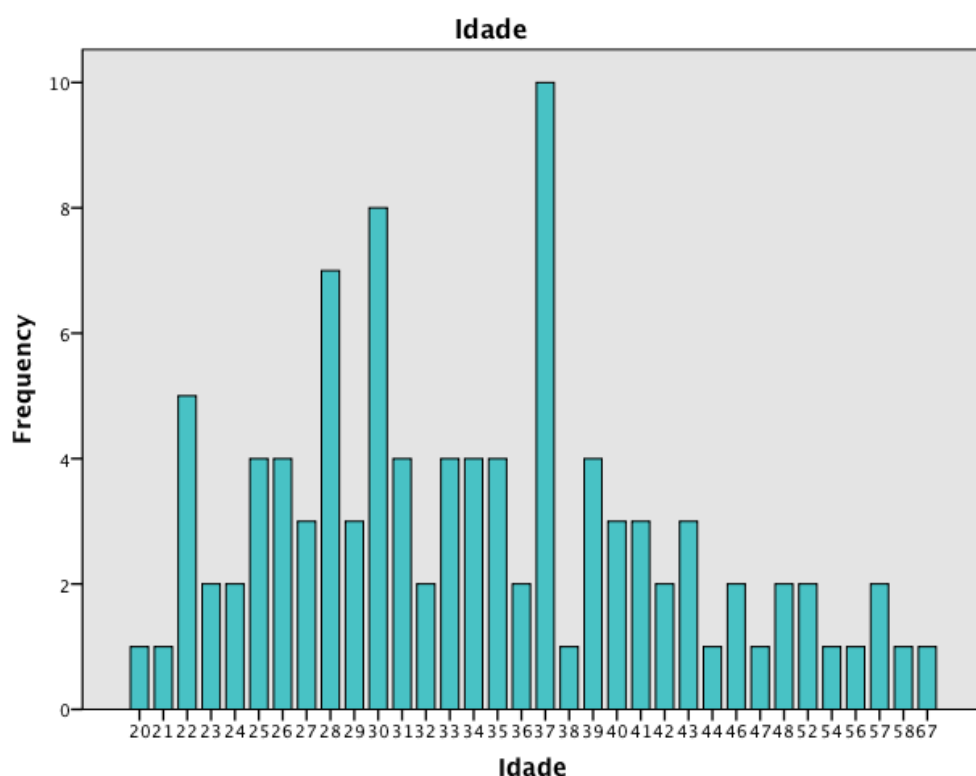
Tab.2 Descrição dos atributos do conjunto de dados analisados

N	Nome	Descrição
1	ID_paciente	Número da amostra (1-100)
2	idade	Idade da paciente
3	Idade \geq 30 anos	Idade da paciente maior ou igual a 30 anos
4	diagn_cito	Diagnóstico citológico
5	abbott	Resultado do teste Abbott RealTime HR HPV (0:negativo; 1:HPV-16 positivo; 2:HPV positivo outros; 3:HPV-16 positivo e outros)
6	abbott_11	Resultado simplificado do teste Abbott RealTime HR HPV (0:negativo; 1:positivo)
7	cobas	Resultado do teste cobas® HPV (0: negativo; 1:HPV-16 positivo; 2:HPV positivo outros; 3:HPV-16 positivo e outros)
8	cobas_11	Resultados simplificado do teste cobas® HPV (0:negativo; 1:positivo)
9	cervista	Resultado do teste Cervista®HPV 16/18 (0:negativo; 1:HPV-16 positivo; 2:HPV positivo outros; 3: HPV-16 positivo e outros)
10	cervista_11HPV	Resultado simplificado do teste Cervista®HPV 16/18 (0:negativo; 1:positivo)
11	aptima_11	Resultado do teste APTIMA® HPV (0:negativo; 1:positivo)
12	HC2_11	Resultado do teste digene® HC2 HPV DNA (0:negativo; 1:positivo)
13	cin_plus	Resultado do teste de CINtec® PLUS (0: negativo; 1:positivo; 2:não conclusivo)
14	cin_plus_11	Resultado do teste de CINtec® PLUS sem não conclusivos (0:negativo; 1:positivo)
15	num_cel	Número de células positivas marcadas nos casos de CINtec® PLUS
16	LA_11	Resultado do teste de genotipagem LINEAR ARRAY® HPV
17	diagn_histo	Diagnóstico histológico (0:normal; 1:sinais de HPV; 2:CIN1; 3:CIN2;4:CIN3)
18	histol_CIN2mais	Diagnóstico histológico simplificado (0:outros; 1:CIN2+)
19	fup_chPV_13	Ginecologista pede ou não teste de HPV ao fim de um ano (1:pediu teste de HPV; 2:não pediu; 3:sem follow-up)
20	result HPV_13	Resultado do teste de HPV (1:positivo-persistência; 2:negativo-clearance)
21	coniz_13	Paciente submetida a conização (1:sim; 2:não; 3:sem follow-up)
22	doença_13	Avaliação de doença no final do estudo (1:sem doença ou \leq CIN1; 2: \geq CIN2; 3: \geq CIN3; 4: sem follow-up)
23	Doencapos followup2anos	Avaliação de doença no final do estudo simplificado (0: sem doença; 1: CIN2+)

Caracterização da população

Idade

Neste estudo foram incluídas amostras de 97 pacientes com LSIL com idades compreendidas entre 20 e 67. A idade média amostral é 35 anos e o desvio padrão é 9,395.



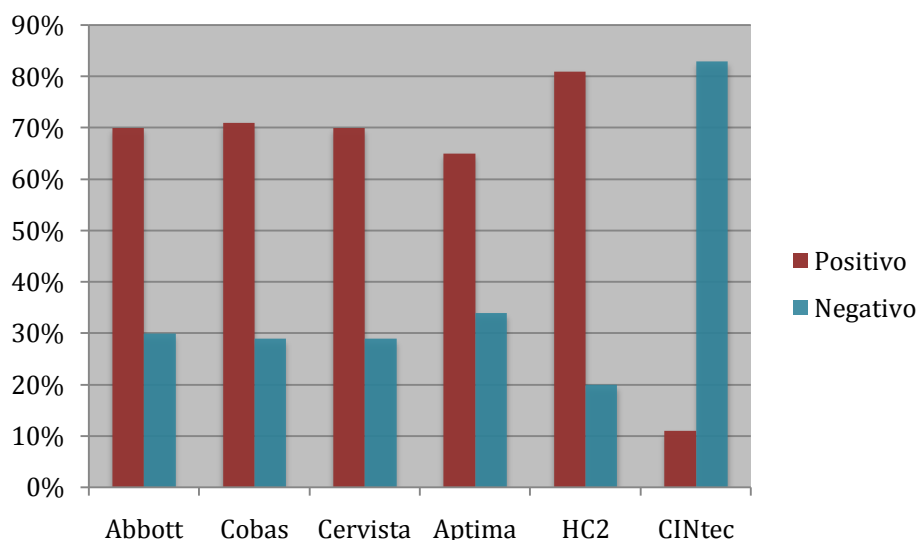
Gráf.1 Gráfico da frequência da distribuição da idade

Nesta amostra, 46,3% das pacientes tinham idade compreendida entre 30 e 40 anos. O que é expectável, dado tratar-se de uma população seleccionada de doença por LSIL, que está descrita como mais frequente nesta faixa etária.

Este grupo é constituído maioritariamente (69%) por mulheres com idade igual ou superior a 30 anos.

Frequência de positivos e negativos

Embora a amostra não seja muito numerosa, foi suficiente grande para perceber que nem todos os testes conseguiram os mesmos resultados.

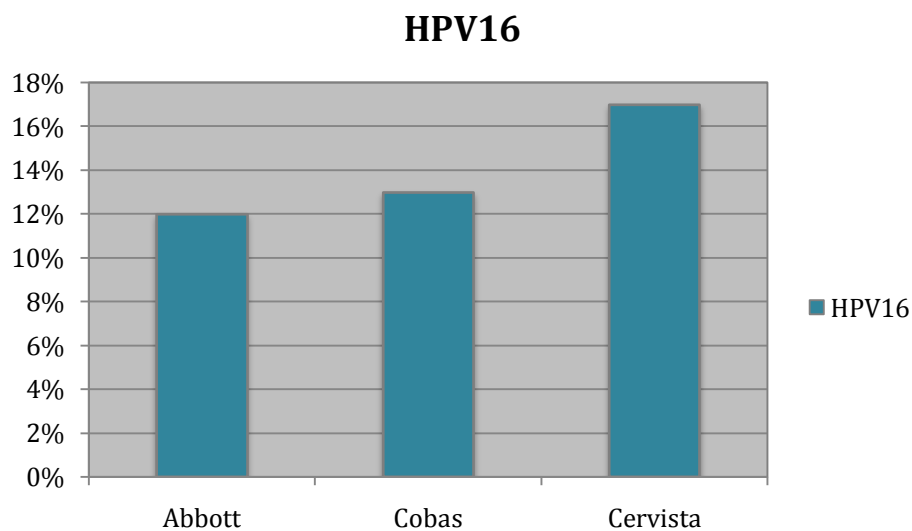


Gráf.2 Gráfico de positividade e casos negativos para os ensaios utilizados neste estudo.

Os testes da nova geração (com genotipagem parcial) tiveram resultados muito semelhantes. O Abbott RealTime HR HPV teve 70% de positivos para HPV HR e o cobas® HPV e o Cervista®HPV 16/18 mais um ponto percentual, 71%. O APTIMA® HPV já teve um comportamento diferente e apresentou apenas 65% de casos positivos para HPV HR. O *digene*® HC2 HPV DNA foi o que obteve mais resultados positivos atingindo os 81%.

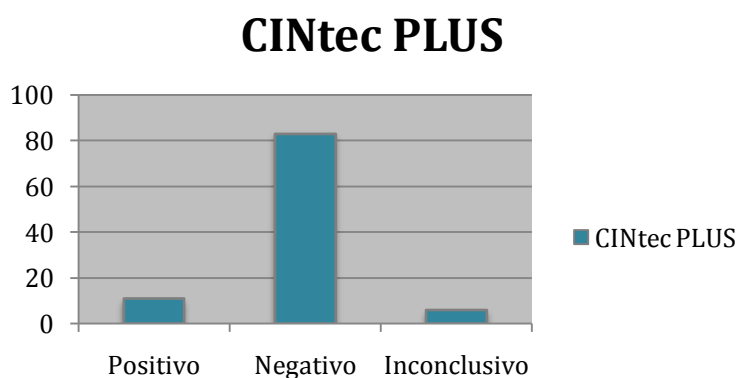
Por fim, o CINtec® PLUS tem um desempenho quase inverso aos restantes testes efectuados, apresentando apenas 11% de casos positivos, sendo normal pois esta técnica indica que há uma desregulação do controlo do ciclo celular.

Nos testes que fazem genotipagem parcial foi possível analisar a percentagem de casos de HPV-16 detectada. É possível verificar que o Cervista®HPV 16/18 detectou 17% de casos de HPV-16, mais do que o Abbott RealTime HR HPV e que o cobas® HPV que detectaram apenas 12% e 13% respectivamente. Estes dados podem ser observados no gráfico seguinte.



Gráf. 3 Gráfico de frequência de HPV-16 para os testes que fazem genotipagem parcial.

Foram apenas observados onze resultados positivos para o CINtec® PLUS, tendo existido 6 casos inconclusivos em que por falta de controlos internos da amostra não foi possível classificar.



Gráf.4 Gráfico de frequência dos resultados do teste Cintec® PLUS.

É necessária, para um resultado de CINtec® PLUS positivo, a presença da marcação simultânea (co-localização de marcação castanha no citoplasma e vermelha no núcleo) na mesma célula. Nos casos em que não exista marcação ou esta não seja simultânea na mesma célula é classificada como CINtec® PLUS negativa.

As imagens seguintes demonstram casos representativos destas duas situações nas amostras deste estudo.

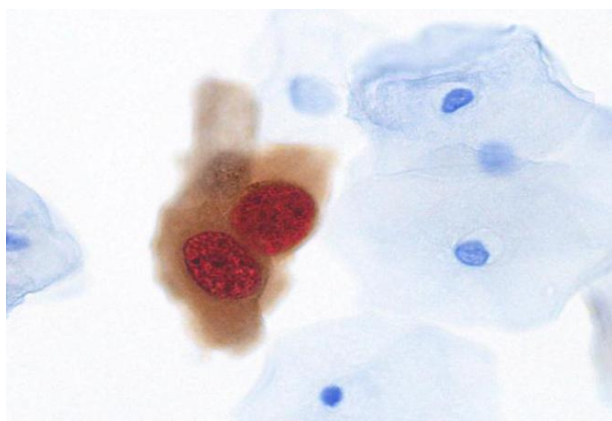


Fig.11 Exemplo de células com marcação dupla p16/Ki-67. Caso positivo

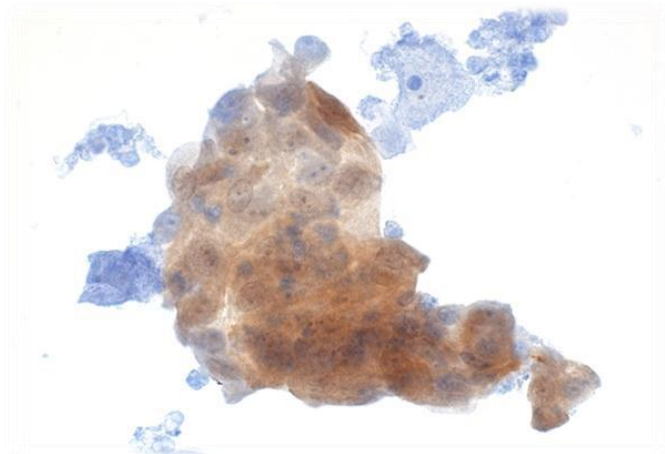


Fig.12 Exemplo de células apenas com marcação p16. Caso negativo

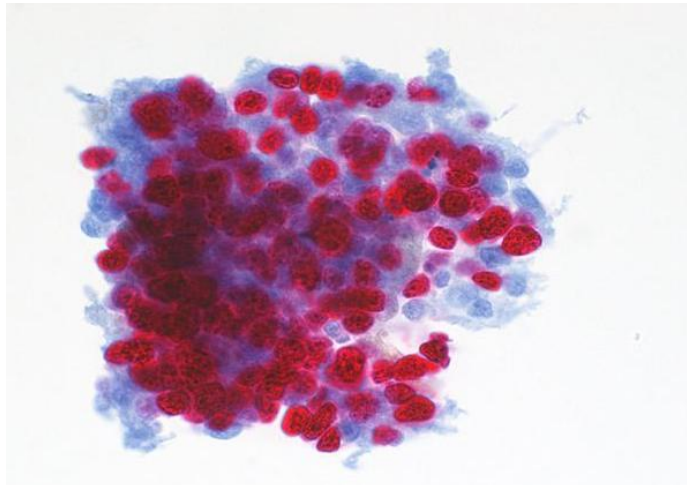


Fig.13 Exemplo de células apenas com marcação ki-67. Caso negativo

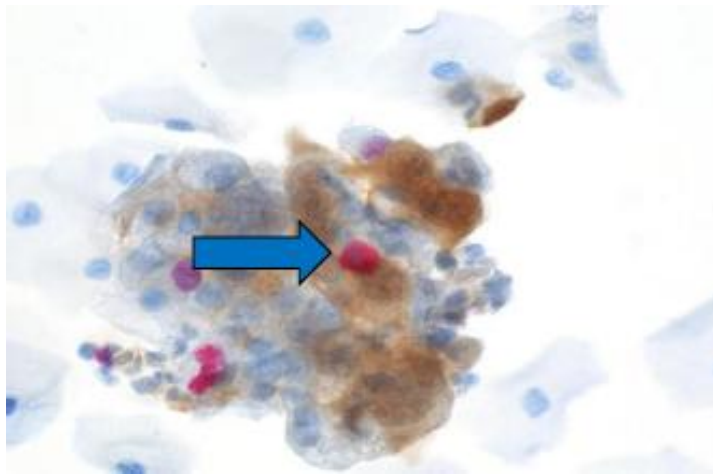


Fig.14 Exemplo de grupo celular com marcação isolada de ambas as proteínas. Caso negativo

Validação estatística dos objectivos de estudo

Objectivo 1 - Comparar as metodologias de detecção de HPV (Abbott RealTime HR HPV, cobas® HPV, Cervista® HPV 16/18, APTIMA® HPV e *digene*® HC2 HPV DNA) e o CINtec® PLUS em termos de concordância entre testes.

O objectivo foi avaliar em que medida as técnicas utilizadas poderiam contribuir para a detecção das lesões displásicas do colo do útero. Admitindo a displasia celular como indicador de lesão celular resultante de infecção por HPV por desregulação do ciclo celular, comparou-se a bateria de testes disponíveis em termos de resultados entre os próprios exames.

Foram avaliados os níveis de concordância entre os testes através do coeficiente de Kappa de Cohen e do teste de McNemar.

A avaliação foi feita em separado para avaliação de testes com resultado positivo e negativo, e seguidamente foram avaliados os testes que fazem genotipagem parcial.

Esta análise só foi realizada para os testes para os quais tínhamos resultados para todas as amostras. Ficaram de fora desta comparação a histologia, de que apenas possuímos 47 casos e o LINEAR ARRAY® HPV que apenas se tinha efectuado em 5 análises.

Tab.3 Comparação dos resultados dos ensaios utilizados considerando o valor do teste estatístico McNemar

MCNEMAR	ABBOTT	COBAS	CERVISTA	APTIMA	HC 2	CINTEC
ABBOTT	-	0,625	1	0,344	0,007	0,000
COBAS	0,625	-	1	0,109	0,022	0,000
CERVISTA	1	1	-	0,063	0,002	0,000
APTIMA	0,344	0,109	0,063	-	0,000	0,000
HC 2	0,007	0,022	0,002	0,000	-	0,000
CINTEC	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-

Os resultados obtidos apresentados na tabela anterior referem-se ao valor de significância estatística de McNemar obtidos na avaliação de semelhança entre testes. Os resultados dos testes de nova geração foram simplificados, sendo classificados apenas como positivo e negativo por forma a fazer esta comparação entre todos os testes.

Tab.4 Comparação dos resultados dos ensaios utilizados considerando o coeficiente de Kappa de Cohen, estando o nível de concordância associado a cores para facilitar interpretação. (Landis J. 1977)

KAPPA	ABBOTT	COBAS	CERVISTA	APTIMA	HC 2	CINTEC
ABBOTT	-	0,900	0,826	0,763	0,586	0,115
COBAS	0,900	-	0,822	0,760	0,628	0,104
CERVISTA	0,826	0,822	-	0,881	0,719	0,110
APTIMA	0,763	0,760	0,881	-	0,613	0,139
HC 2	0,586	0,628	0,719	0,613	-	0,066
CINTEC	0,115	0,104	0,110	0,139	0,066	-

Os valores de Kappa de Cohen demonstraram uma concordância excelente para a relação entre os testes de nova geração, com genotipagem parcial. A concordância entre o cobas® HPV e o Abbott RealTime HR HPV chega mesmo aos 0,900.

O APTIMA® HPV possui uma concordância excelente com o Cervista®HPV 16/18, e uma concordância substancial com Abbott RealTime HR HPV e cobas® HPV.

O CINtec® PLUS tem apenas concordância ligeira com os outros testes. Esta avaliação já tinha sido possível através da análise dos casos positivos cujo número era muito inferior para este teste se comparado com os outros.

Tab.5 Comparação dos resultados dos ensaios com genotipagem parcial utilizados considerando o valor do teste estatístico McNemar

MCNEMAR	ABBOTT	COBAS	CERVISTA
ABBOTT	-	0,136	0,027
COBAS	0,136	-	0,152
CERVISTA	0,027	0,152	-

Para estes níveis de significância estatística de McNemar muito exigentes, deveria rejeitar-se a hipótese nula (H_0) pois o $p \geq 0,05$.

Tab.6 Comparação dos resultados dos ensaios com genotipagem parcial considerando o coeficiente de Kappa de Cohen, estando o nível de concordância associado a cores para facilitar interpretação. (Landis J. 1977)

KAPPA	ABBOTT	COBAS	CERVISTA
ABBOTT	-	0,873	0,689
COBAS	0,873	-	0,705
CERVISTA	0,689	0,705	-

Para a avaliação da congruência entre ensaios que avaliam a genotipagem parcial de HPV, usou-se novamente os valores de Kappa de Cohen.

Uma concordância excelente foi verificada entre o Abbott RealTime HR HPV e o cobas® HPV. Entre Cervista®HPV 16/18 e Abbott RealTime HR HPV e cobas® HPV a concordância foi substancial.

Objectivo 2 - Avaliar a especificidade e sensibilidade na identificação de CIN2+ com CINtec® PLUS

Através de tabelas de verdade com a distribuição dos resultados foi possível obter os valores para calcular devidamente a especificidade e sensibilidade do CINtec® PLUS.

O cálculo da especificidade e sensibilidade foi feito separadamente para mulheres com menos de 30 anos, e com idade igual ou superior a 30 anos.

Não existiram, neste estudo, mulheres com menos de 30 anos e com CINtec® PLUS positivo, pelo que a especificidade neste grupo é de 100%. No entanto, existiam casos positivos nas mulheres com idade igual ou superior a 30 anos e obtiveram-se após os cálculos os seguintes resultados: uma sensibilidade de apenas 50%, uma especificidade bastante elevada de 92%.

O valor preditivo negativo do CINtec® PLUS foi de 87% e o valor preditivo positivo foi 53%.

Objectivo 3 - Avaliar a especificidade e sensibilidade na identificação de CIN2+ com a detecção de DNA de HPV de alto risco por métodos de Biologia Molecular

Foram novamente analisadas tabelas de verdade com a distribuição dos resultados para calcular devidamente a especificidade e sensibilidade dos ensaios de HPV.

O cálculo da especificidade e sensibilidade foi feito mais uma vez em separado para mulheres com menos de 30 anos, e com idade igual ou superior a 30 anos.

O Abbott RealTime HR HPV teve no grupo de mulheres <30 anos uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de apenas 33%. Em relação ao grupo de mulheres com idade igual ou superior a 30 anos, demonstrou uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 32%. O valor preditivo positivo foi de apenas 24%, mas o valor preditivo negativo atingiu os 93%.

O cobas® HPV teve valores semelhantes ao Abbott RealTime HR HPV. No grupo de mulheres <30 anos apresentou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 33%. Em relação ao grupo de mulheres com idade igual ou superior a 30 anos, demonstrou uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 32%. Uma vez mais, o VPN foi bastante elevado atingindo mesmo os 100%, já o VPP é de apenas 26%.

O Cervista®HPV 16/18 sendo o último dos testes de genotipagem parcial por avaliar, apresenta resultados semelhantes aos dois anteriores.

O APTIMA® HPV aparenta ser um teste mais “equilibrado”, demonstra no grupo de mulheres <30 anos uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 42% (a especificidade mais elevada de todo o teste). No grupo de mulheres com idade igual ou superior a 30 anos, apresentou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 36%

No que diz respeito ao VPP do APTIMA® HPV foi de 28%, e VPN tal como os anteriores atingiu os 100%.

Por fim, a *digene*® HC2 HPV DNA apresenta sensibilidade de 100% nos dois grupos etários. Mas a especificidade é baixa, de 25% nas mulheres <30 anos e 18% nas outras. O VPP não ultrapassa os 23% e o VPN mais uma vez é de 100%.

A especificidade dos testes de HPV é, conforme esperado, relativamente baixa.

Seguidamente são apresentadas as tabelas com todos os valores calculados para todos os testes estudados.

Tab.7 Sensibilidade calculada para as metodologias analisadas e apresentada em forma de percentagem (%). Foi calculada a sensibilidade para as diferentes faixas etárias e para *endpoints* diferentes: resultado de histologia CIN2+ e avaliação de “doença” após *follow up* de dois anos.

SENSIBILIDADE (%)	Abbott	Cobas	Cervista	Aptima	HC2	Cintec
<30 anos Histologia CIN2+	100	100	100	100	100	0
≥30 anos Histologia CIN2+	90	90	90	100	100	50
<30 anos Follow-up 2 anos	100	100	100	100	100	0
≥30 anos Follow-up 2 anos	90	100	100	100	100	50

Tab.8 Especificidade calculada para as metodologias analisadas e apresentada em forma de percentagem (%). Foi calculada a especificidade para as diferentes faixas etárias e para *endpoints* diferentes: resultado de histologia CIN2+ e avaliação de “doença” após *follow up* de dois anos

ESPECIFICIDADE (%)	Abbott	Cobas	Cervista	Aptima	HC2	Cintec
<30 anos Histologia CIN2+	33	33	33	42	25	100
≥30 anos Histologia CIN2+	32	32	32	36	18	92
<30 anos Follow-up 2 anos	35	35	40	50	30	89
≥30 anos Follow-up 2 anos	32	32	28	68	17	93

Objectivo 4 - Avaliar se o CINtec® PLUS é um melhor preditor de risco de lesão do que os outros testes estudados? O que acresce o teste de CINtec® PLUS?

Como demonstrado nas tabelas seguintes o CINtec® PLUS possui um VPP de 53%, é o valor de verdadeiros positivos do teste e na realidade falhou quase metade dos casos CIN2+.

Tab.9 VPP calculado para as metodologias analisadas e apresentada em forma de percentagem (%). Foi calculado o VPP para uma prevalência de 19%

VALOR PREDITIVO POSITIVO (%)	Abbott	Cobas	Cervista	Aptima	HC2	Cintec
Histologia CIN2+	24	26	26	28	23	53

Tab.10 VPN calculado para as metodologias analisadas e apresentada em forma de percentagem (%). Foi calculado o VPN para uma prevalência de 19%

VALOR PREDITIVO NEGATIVO (%)	Abbott	Cobas	Cervista	Aptima	HC2	Cintec
Histologia CIN2+	93	100	100	100	100	87

Em relação ao valor preditivo negativo, é o valor mais baixo entre todas as metodologias analisadas, mas é necessário ter em conta que ao contrário dos outros testes biomoleculares, este teste necessita que na amostra, isto é, na lâmina observada ao microscópio, existam as células positivas. O problema da amostragem já não se coloca quando nos referimos aos testes moleculares.

Objectivo 5 - Verificar a existência de uma correlação da análise citológica da quantidade de células positivas para CINtec® PLUS, com da gravidade da lesão. Haverá uma relação proporcional?

Dos 11 casos positivos para CINtec® PLUS foram contabilizadas as células positivas e correlacionadas com o tipo de lesão. Os resultados foram variáveis. Para \leq CIN1 habitualmente o número de células rondou os 6 a 20 células por lâmina, mas houve um caso com 39 células marcadas. Havia apenas um caso de CIN2 que era CINtec® PLUS positivo e tinha 40 células marcadas. Os casos CIN3 estudados tanto têm relativamente poucas células (11-15) como 26 células e havia mesmo um que tinha 43 células positivas. Um dos casos com 13 células marcadas não teve *follow up*.

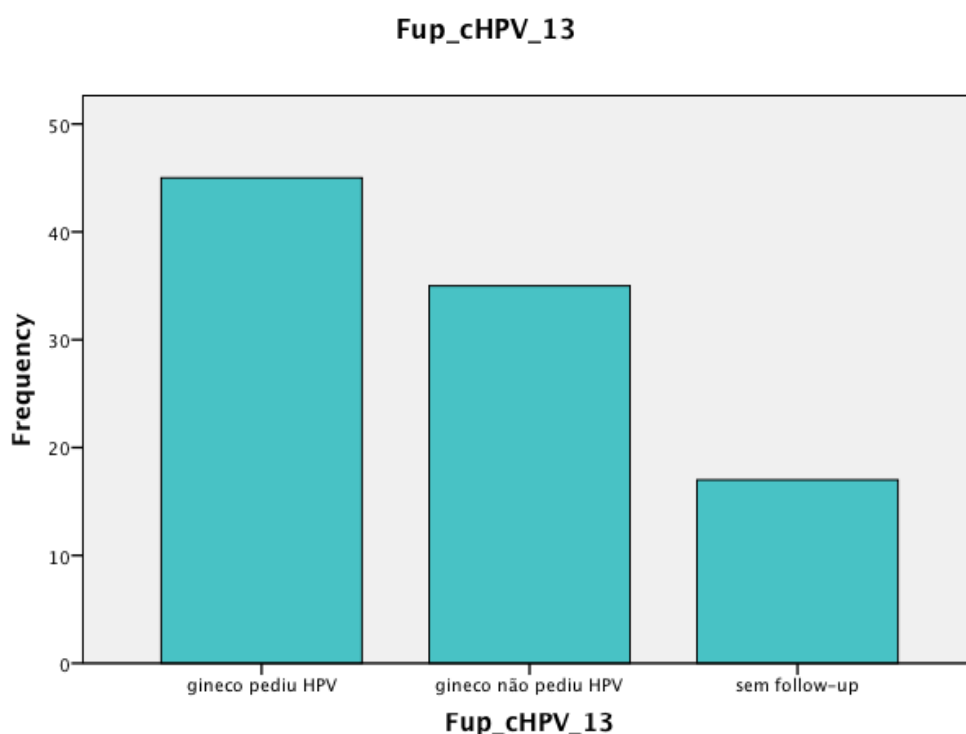
Tab. 11 Tabela representativa do número de células presentes numa lâmina com resultado CINtec® PLUS positivo, comparativamente ao CIN.

NÚMERO DE CÉLULAS	\leq CIN1	CIN2	CIN3	SEM FOLLOW-UP
1-5				
6-10	2			
11-15	1		2	1
16-20	1			
21-25				
26-30			1	
31-35				
36-40	1	1		
41-50			1	

Objectivo 6 - Avaliar a intervenção dos ginecologistas na utilização das guidelines da ASCCP

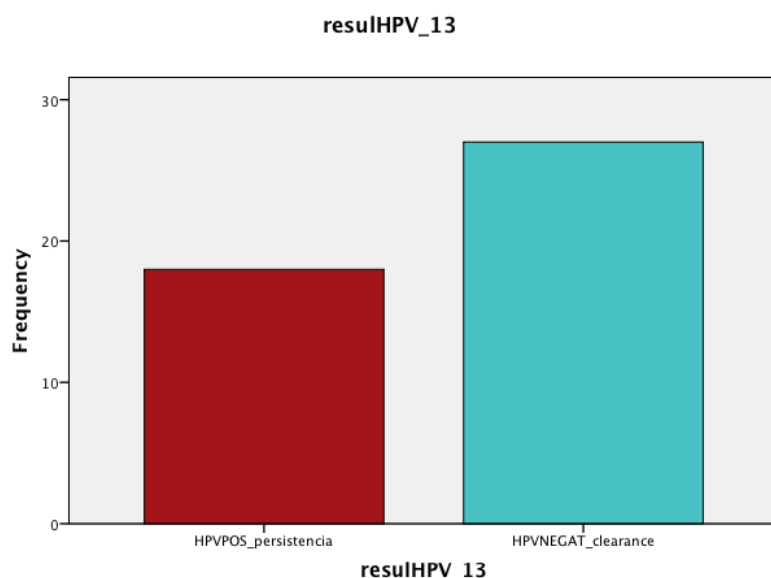
Por último, foi avaliado se os ginecologistas utilizam os algoritmos da ASCCP e incluem o teste de HPV na avaliação ao ano. Verificou-se que 46,4% dos ginecologistas seguem essa metodologia pedindo teste de HPV, 36,1% dos ginecologistas não pediram teste após um ano.

Infelizmente, em 17,5% dos casos não foi possível ter acesso a dados do *follow up*.



Gráf.5 Gráfico representativo da avaliação do pedido de teste de HPV por parte do ginecologista.

Do resultado deste pedido de HPV, registou-se que em 40% dos casos houve persistência da infecção, resultado de teste de HPV positivo. Houve uma maior percentagem de casos, 60%, cujo resultado do teste de HPV foi negativo, indicando *clearance* da infecção por HPV.



Gráf.6 Gráfico que demonstra o resultado dos testes de HPV que foram efectivamente pedidos por parte do ginecologista.

Ao analisar os dados, colocou-se uma nova questão: valeria a pena ter feito uma abordagem mais agressiva que culminasse na conização? Esta questão surgiu por verificação do resultado de histologia dos casos em que foi feita conização. Foram efectuadas 4 conizações com histologia CIN3, 6 conizações com histologia CIN2, 5 conizações com histologia CIN1, e por fim 3 conizações com resultado de histologia de apenas sinais de HPV.

Tab.12 Tabela de verdade que demonstra a contagem de conizações efectuadas consoante o diagnóstico histológico

		Diagnóstico Histológico					
		Normal	Sinais de HPV	CIN1	CIN2	CIN3	Total
Conização							
	SIM	0	3	5	6	4	18
	NÃO	4	15	7	2	1	29

Discussão de Resultados

Em relação à primeira análise de positividade apresentada para cada metodologia, sabe-se que o teste *digene*® HC2 HPV DNA, foi já descrito na literatura, como tendo muitos casos positivos. Como esperado mostrou uma taxa de positividade muito elevada, o que neste grupo seleccionado faz todo o sentido, dado tratar-se de casos de LSIL que está descrito serem o maior problema de erros na captura híbrida. Há maior hibridização cruzada por cargas virais muito elevadas de LR-HPV. Vários estudos demonstram a maior tendência para o *digene*® HC2 HPV DNA ser positivo relativamente a outros testes devido a reacção cruzada com tipos de HPV-40, -43, -44, -53, -54, -60, -70, -74. Obteve-se cerca de 10% mais de positividade para o *digene*® HC2 HPV DNA relativamente aos testes de nova geração, mas estudos dizem que a extensão da hibridização cruzada pode chegar aos 49%. Outra característica negativa em comparação com os testes de segunda geração é a falta de controlo interno. (Castle P. 2002; Safaeian M. 2007; M. 2008; Wentzensen N. 2009)

Estes resultados corroboram as *guidelines* da ASCCP quando estas indicam que não existe indicação para rastrear com teste de HPV mulheres com citologia de LSIL.

No entanto, os resultados dos testes de nova geração podem relançar esta questão, especialmente o caso do teste APTIMA® HPV. (Group 2013)

Os testes de HPV têm uma elevada sensibilidade mas têm níveis de especificidade muito baixos, já que a prevalência de HPV sofre elevada variação na população, por exemplo com a idade. Sabe-se que à medida que a idade aumenta, a positividade diminui, o que melhora a *performance* do teste.

O Cervista®HPV 16/18 mostrou uma detecção mais elevada de HPV-16 comparado com os outros dois testes com genotipagem parcial. Foi já demonstrado que o Cervista®HPV 16/18 exhibe uma reacção cruzada quando sujeito a elevados níveis de carga viral de HPV-31, como está mencionado no *package insert* do teste. Este facto pode ser explicado por existirem reacções cruzadas com o HPV-31, e quando este tem mais de 10^7 de cópias por reacção, o teste pode ser HPV-16 positivo. No entanto, apenas com genotipagem destas amostras é possível ter a certeza, se se trata verdadeiramente de um falso positivo do HPV-16.

Objectivo 1 - Comparar as metodologias de detecção de HPV (Abbott RealTime HR HPV, cobas® HPV, Cervista® HPV 16/18, APTIMA® HPV e *digene*® HC2 HPV DNA) e o CINtec® PLUS em termos de concordância entre testes.

Na maior parte dos casos analisados as correlações obtidas foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) à excepção de alguns casos em que as correlações calculadas foram muito baixas, apresentando valores de $p \geq 0,05$.

As baixas correlações são justificadas pela reduzida amostragem estudada. Sendo poucos os casos no estudo, um pequeno número de discordâncias entre dois ensaios é suficiente para que o valor de Kappa baixe significativamente. E por conseguinte também a qualidade da correlação entre os ensaios.

Em relação aos resultados do teste de McNemar, estes não apresentaram o verdadeiro valor do teste, isto deveu-se ao facto do SPSS ter assumido sempre que os dados admitiam uma distribuição binomial, apresentando apenas os valores correspondentes à sua significância estatística.

Para a maior parte dos ensaios, os testes de McNemar apresentaram um valor de significância estatística superior a 0,05, indicando que se deveria rejeitar a hipótese nula, isto é, a probabilidade de um caso ser declarado negativo por um primeiro método e positivo por um segundo método, é diferente da probabilidade de um caso ser declarado positivo pelo primeiro método e negativo pelo segundo.

Novamente, ocorreram algumas excepções, sobretudo nos casos em que se verificaram piores correlações, e a significância estatística foi inferior a 0,05, indicando que devia ser aceite a hipótese nula.

Objectivo 2 - Avaliar a especificidade e sensibilidade na identificação de CIN2+ com CINtec® PLUS

O CINtec® PLUS obteve uma elevada especificidade, isto é a probabilidade de ser CINtec® PLUS negativo na ausência de lesão. Contudo, falhou quase metade dos casos de CIN2+. Por comparação com outros estudos eram esperados valores de sensibilidade mais elevados, mas na realidade esta não foi superior a 50%.

Assim, não deverá ser utilizado como teste de primeira linha, pois com uma sensibilidade baixa não possui capacidade de afastar a doença na fase inicial de diagnóstico.

Estes resultados, de sensibilidade e especificidade, demonstram alguma fragilidade desta técnica e falta de reprodutibilidade já que noutros estudos, como o EEMAPS, os resultados foram mais satisfatórios.

Objectivo 3 - Avaliar a especificidade e sensibilidade na identificação de CIN2+ com a detecção de DNA de HPV de alto risco por métodos de Biologia Molecular

No que diz respeito à sensibilidade, todos os testes de HPV atingiram quase 100%.

A especificidade dos testes de HPV foi, conforme esperado, relativamente baixa.

O teste de HR-HPV não tem sido recomendado para casos de LSIL pois o resultado é na maioria das vezes positivo para presença de HPV (cerca de 80% com *digene*® HC2 HPV DNA foi apresentado no estudo ALTS). No entanto, quando efectuada a triagem de casos de alto risco em simultâneo com a citologia já influencia o algoritmo actual. (Group 2013)

Nos casos de LSIL, a elevada prevalência de infecções transitórias com HR-HPV positivo reduz a especificidade dos testes de HPV daí a importância de se encontrar um marcador mais específico.

Durante algum tempo os testes de HPV validados forneciam apenas a informação de presença ou ausência de vírus, não permitindo diferenciar as infecções transitórias das potencialmente transformadoras. O aparecimento dos testes de HPV de nova geração, com genotipagem parcial, foi importantíssimo na avaliação de prognóstico e na monitorização da doente. Por exemplo, na avaliação de risco absoluto para desenvolvimento de lesões através de infecção por HPV, o subtipo -16 é muitíssimo superior ao de outros subtipos víricos, pelo que, a abordagem desta doente deverá ser completamente diferente. (Kinney W. 2010)

Está ainda em avaliação a importância dos outros HR-HPV, dada a variação da prevalência consoante população. As infecções múltiplas continuam a ser um acontecimento comum. Todos estes factores fazem com que mesmo com esta nova panóplia de testes com maiores sensibilidades, especificidades e no fundo mais informativos, sejam insuficientes. Questiona-se a importância de biomarcadores como a presença de sobre-expressão de proteínas celulares (p16^{INK4a} e Ki-67) em células infectadas por HPV.

Objectivo 4 - Avaliar se o CINtec® PLUS é um melhor preditor de risco de lesão do que os outros testes estudados? O que acresce o teste de CINtec® PLUS?

O CINtec® PLUS é um teste bastante específico, mas em termos de sensibilidade ficou aquém do esperado. Mediante a evidência estatística não foi possível provar que este teste é um melhor preditor de lesão. Este ensaio tem como desvantagem apenas poder marcar como positivas ou negativas células presentes na lâmina. Não deverá ser

descartado por completo este exame pois traz várias vantagens já enumeradas e pode ser um bom exame auxiliar de diagnóstico.

O VPN é de 87% que não é tão elevado quanto os outros testes analisados mas espera-se que com a automatização da técnica e com lâminas feitas com colheitas recentes e lâminas apenas para aquele efeito que se consiga ultrapassar um VPP de 90%.

Em termos de especificidade é superior aos outros testes, devido à natureza do teste. Os testes de HPV podem ser positivos e tratar-se de uma infecção transitória apenas, mas é positivo na mesma por estar a infecção presente. A vantagem do CINtec® PLUS é apenas ser positivo quando há desregulação do ciclo celular.

Objectivo 5 - Verificar a existência de uma correlação da análise citológica da quantidade de células positivas para CINtec® PLUS, com da gravidade da lesão.

Haverá uma relação proporcional?

O *kit* comercial de CINtec® PLUS e os estudos feitos pela MTM Laboratories defendem que basta apenas uma célula marcada como positiva para considerar o teste CINtec® PLUS positivo. Poderá ser significativo então avaliar a quantidade de células marcadas? Os resultados não foram muito explícitos neste sentido pois existiam apenas 11 casos positivos, pelo que não é possível extrapolar esta informação provinda de um grupo tão pequeno. (AG 2009)

A ideia de estudar o número de células surgiu por se verificar que nos controlos positivos utilizados em cada série (que eram casos de HSIL), as células positivas eram abundantes. No entanto, as lâminas de controlos positivos foram todas lâminas realizadas com o propósito do CINtec® PLUS ao contrário das outras lâminas que foram estudadas após coloração de rotina. Estas últimas são lâminas que tiveram de ser descoradas e às quais se teve de retirar a lamela, tudo processos agressivos que fazem com que haja perda de grupos celulares e que enviesam o resultado.

Três das lâminas que foram consideradas positivas pertencem ao grupo de lâminas que foram repetidas por problemas de leitura dúbia e falha de controlos. Isto significa que foram feitas novas lâminas com o material residual, o que mais uma vez vai alterar o número de células positivas esperado para este tipo de lesões.

Por todas estas possíveis distorções é possível dizer que é correcto respeitar o número mínimo (1) de células referido na bula do ensaio, e que não tem significado estatístico o número de células positivas presentes neste estudo. Esse estudo deverá englobar mais casos positivos e as mesmas condições de amostras e amostras “frescas” para uns resultados mais exactos. (Sherman M. 2003)

Objectivo 6 - Avaliar a intervenção dos ginecologistas na utilização das guidelines da ASCCP

As últimas *guidelines* defendem o pedido de HPV após um ano de detectada a lesão de LSIL. Tentou avaliar-se se os ginecologistas seguem os algoritmos da ASCCP e fazem controlo de *follow up* com pedido de HPV. Verificou-se que menos de metade dos ginecologistas seguiram as *guidelines*, e 36,1% dos ginecologistas não pediram testes após um ano.

Em 17,5% dos casos não foi possível fazer esta avaliação dada a inexistência de dados. Na prática privada é difícil o seguimento dos doentes pela facilidade em recorrer a segundas opiniões após um resultado, que é complicado de compreender por parte da paciente. Deparando-se com a informação de que é necessário aguardar, sem efectuar qualquer tipo de intervenção numa lesão existente, a doente fica por vezes assustada e procura novas respostas com novo ginecologista ou, em raros casos, não volta ao ginecologista com medo de enfrentar um possível mas improvável CCU.

Possivelmente, como forma de prevenir estas perdas de seguimento das doentes, os clínicos acabam por realizar tratamentos dispensáveis, como crioterapia ou mesmo conizações desnecessárias. Neste estudo verificou-se que foram efectuadas 18 conizações neste grupo de mulheres. Tendo em conta que 10 mulheres tinham CIN2+ na histologia, é compreensível que se considere que algumas conizações pudessem ser dispensáveis.

É preciso ter em conta nestes números que, muitas vezes e sem razão patológica aparente, uma mulher com idade mais avançada, ou com miomas ou outra patologia benigna e muitas vezes sem desejo de engravidar novamente, possa justificar uma conização ou até mesmo histerectomia.

O conhecimento do comportamento biológico da infecção por HPV permite, com segurança, manter estas mulheres em vigilância, para afastar a possibilidade destas lesões corresponderem a infecções transitórias, na ausência de um marcador com valor prognóstico. Estes casos de hipertratamento devem ser evitados, sobretudo em mulheres jovens porque podem ter consequências numa gravidez futura (parto pré-termo)

Mas também porque o colo do útero se torna mais sensível a agressões e de difícil interpretação através da colposcopia.

Conclusão

O rastreio do CCU, utilizando como método de detecção a citologia é ainda hoje o utilizado no programa de *screening*. No entanto, devido ao aparecimento das técnicas de Biologia Molecular e às limitações da citologia, estes testes têm sido usados em conjunto de forma a conferir maior informação de diagnóstico e essencialmente prognóstico. Contudo, mesmo com avançados testes de detecção de HR-HPV com genotipagem parcial simultânea, alguns casos carecem de mais estudos.

A detecção de HR-HPV nas lesões de LSIL é muito frequente, no entanto nada diz sobre o prognóstico. (Bosch F 2006; Wentzensen N 2006; Wentzensen N 2007; Tsoumpou I 2009; Schiffman M 2011)

Actualmente, a orientação de seguimento de mulheres com citologia LSIL é a colposcopia imediata, com o objectivo de detectar lesões de CIN2+, e a observação com citologia e repetição do teste de HR-HPV ao ano, sabendo-se que cerca de 50% vai fazer o *clearance* aos 6 meses. (Group 2000; Wentzensen N 2006; Wentzensen N 2007; AG 2009; Denton K 2010)

Pretendeu-se com este trabalho avaliar se a metodologia CINtec® PLUS poderá contribuir para uma avaliação de risco imediato de CIN2+ neste grupo de doentes, evitando a colposcopia imediata nos casos CINtec® PLUS negativos.

Esperava-se que este teste permitisse seleccionar, entre as mulheres com citologia de LSIL, as mais propensas a desenvolver lesão de alto grau e encaminhá-las para colposcopia; e que permitisse avaliar também se os resultados negativos poderiam, com segurança, fazer retornar estas pacientes ao rastreio normal.

Neste estudo não era pretendido tirar ilações para a população geral, em virtude de os dados extraídos pertencerem a uma amostra de conveniência. Foi no entanto possível, correlacionar dados de biologia molecular com dados citológicos, de amostras colhidas ao longo de dois anos.

O CINtec® PLUS obteve uma elevada especificidade mas falhou quase metade dos casos de CIN2+. Por comparação com outros estudos, eram esperados valores de sensibilidade mais elevados, mas na realidade esta não foi superior a 50%.

Existem alguns aspectos que podem ajudar a explicar este resultado. Um deles é o facto das lâminas utilizadas para a técnica CINtec® PLUS já terem sido as lâminas originais de interpretação de LSIL, sendo necessário remover a lamela o que pode ter originado

descolamento e portanto perda de alguns grupos celulares, o que pode afectar o resultado final. Nos casos em que foi repetido o ensaio, foram efectuadas novas lâminas com material residual e o facto de a mesma amostra ter sido utilizada para a realização de todos os testes fez com que esta fosse perdendo representatividade celular.

Outro problema foi a idade das amostras. Elas foram todas colhidas em 2011, mas o CINtec® PLUS foi apenas efectuado em 2012, pelo que a idade da amostra pode também fazer variar os resultados. Os resultados da imunocitoquímica estão intimamente ligados à qualidade das células coradas. (AG 2009)

A automatização Ventana® BenchMark que irá ser implementada em breve deverá melhorar a reprodutibilidade do teste e minimizar estas questões técnicas.

É suposto o CINtec® PLUS ser mais afectado pela quantidade de material na amostra porque é necessária a presença das células para estas serem ou não marcadas.

Na prática clínica, isto pode ser uma limitação porque a qualidade das colheitas varia entre clínicos, e no caso de amostras de citologia convencional isto torna-se ainda mais evidente.

Os testes de HPV são menos afectados por este problema. Aliás, muitas lesões CIN2+ detectadas por testes de HPV, mas falhadas na citologia, são lesões muito pequenas. (Yang H. 2012)

O VPP desta amostra não é muito bom porque não há biópsias de todos os casos, e pior ainda, outros casos foram perdidos para *follow up*.

Concluindo, em resposta ao grande objectivo deste estudo que era avaliar se o CINtec® PLUS poderia contribuir para uma avaliação de risco imediato de CIN2+ no grupo de mulheres LSIL evitando a colposcopia imediata nos casos negativos, a resposta é não. Como se pôde observar anteriormente, um resultado negativo não é seguro para excluir uma paciente com LSIL de avaliação por colposcopia. Mas dado o enviesamento desta amostra, aceita-se que este teste possa ter um comportamento diferente quando efectuado em lâminas frescas e com metodologia automatizada. Carece de mais estudo para avaliar se realmente pode ter impacto na decisão de exclusão de exame de colposcopia, ou se a sua intervenção será como triagem do grupo de citologia normal e HPV positivo para alto risco excluindo os HPV-16 e -18.

Este grupo de baixo risco actualmente tem indicação para *follow up* ao ano e o papel do CINtec® PLUS será o de seleccionar casos para colposcopia imediata; outra área não menos importante será o de ser possível ser utilizado em CCV de ASC-H ou AGC.

Este método é relativamente recente e a sua metodologia automatizada ainda não foi lançada. Serão necessários estudos em séries alargadas para avaliar de uma forma mais aprofundada a hipótese de o CINtec® PLUS ser integrado nos algoritmos de rastreio.

Referências Bibliográficas

(2009). "MicrobiologyBytes - Virology." Retrieved Junho 2013, from <http://www.microbiologybytes.com/virology/Papillomaviruses.html>.

AG, R. m. l. (2009). CINtec® PLUS Cytology Manual. Germany.

Arbyn M, d. S. S., Saraiya M, et al (2012). "EUROGIN 2011 roadmap on prevention and treatment of HPV-related disease." International Journal of Cancer **131**(9): 1969-1982.

Bibbo, M. (1997). Comprehensive Cytopathology, W.B. Saunders Company.

Bosch F, Q. Y., et al (2006). "The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer." Internation Journal of Gynecology and Obstetrics(94): S8-S21.

Burd, E. (2003). "Human Papillomavirus and Cervical Cancer." Clinical Microbiology Reviews **16**(1): 1-17.

Carozzi F, C. M., Palma p, et al. (2008). "Use of p16INK4a overexpression to increase the specificity of human papillomavirus testing: a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial." Lancet Oncology **9**: 937-945.

Castle P., S. M., Burk R., et al. (2002). "Restricted Cross-Reactivity of Hybrid Capture 2 with Nononcogenic Human Papillomavirus Types." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**: 1394-1399.

Contracepção, S. P. d. (2010-2012). Retrieved June 2013, from <http://www.spdc.pt/>.

Corporation, D. (2004). Hybrid Capture 2 High-risk HPV DNA Test. USA.

Cotran R., K. V., Collins T. et al (2000). Robbins Patologia Estrutural e Funcional, Guanabara Koogan.

Cuschieri K, W. N. (2008). "HPV mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **17**(10): 2536-2545.

Cuzick J., A. L., Bergeron C., Szarewski A. et al (2010). "Performance of the Abbott RealTime High-Risk HPV Test in Women With Abnormal Cervical Cytology Smears." Journal of Medical Virology **82**: 1186-1191.

D, F. E. a. H. (2005). "Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control." Vaccine **23**: 2388-2394.

D., G. R. a. P. (2009). "Cervical cancer: From Hippocrates through Rigoni-Stern to zur Hausen." Vaccine **27**: A4-A5.

Darragh T., C. T., Cox T. Stoler M. et al (2012). "The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and Consensus Recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology." Arch Pathol Lab Med **136**: 1266-1297.

Denton K, B. C., Klement P, et al (2010). "The sensitivity and specificity of p16INK4a cytology vs HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage os ASCUS and LSIL pap cytology results." Am J Clin Pathol **134**: 12-21.

F, P. M. a. B. (2006). "The burden of HPV-related cancers." Vaccine **24 Suppl 3**: S3/11–S13/25.

Ferlay J., S. H., Bray F. et al (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." International Journal of Cancer **127**: 2893–2917.

GM Clifford, J. S., M Plummer, N Muñoz and S Franceschi (2003). "Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis." British Journal of Cancer **88**: 63-73.

Group, A. (2000). "Human papillomavirus testing for triage of women with cytological evidence of low grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial." J Natl Cancer Inst **92**(5): 397-402.

Group, C. (2013). "Algorithms Updated Consensus Guidelines for Managing Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors." American Society for Colposcopy and Cervical Pathology.

Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nature reviews - Cancer **2**.

Heideman D., H. A., Meijer C., Snijders P. et al (2013). "The APTIMA HPV assay fulfills the cross-sectional clinical and reproducibility criteria of international guidelines for HPV test requirements for cervical screening." J. Clin. Microbiol.

Henry, M. (2003). "The Bethesda System 2001: an update of new terminology for gynecologic cytology." Clin Lab Med **23**(3): 585-603.

Ho G., B. R., Beardsley L., Chang C. and Burk R. (1998). "**Natural History of Cervico-vaginal Papillomavirus Infection in Young Women.**" The New England Journal of Medicine **338**(7): 423-428.

Ikenberg H., B. C., Schmidt D. et al for the PALMS Study Group (2013). "Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study." J Natl Cancer Inst **105**(20).

K., A. A. a. B. (2010). "Molecular Diagnostics of Human Papillomavirus." LABMEDICINE **41**(9): 523-530.

K. Syrjanen, L. D. B., L. Gonçalves, F. C. Schmitt et al (2010). "Cervical cancer screening in Mediterranean countries: implications for the future." Cytopathology **21**(6): 359-367.

Khan M., C. P., Lorincz A. et al (2005). "The Elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 or 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice." J Natl Cancer Inst **97**: 1072-1079.

Kinney W., S. M., Castle P. (2010). "Patient Safety and the Next Generation of HPV DNA Tests." Am J Clin Pathol **134**: 193-199.

Kjaer S., C. B., Van den Brule A., et al. (2001). "High-Risk Human Papillomavirus Is Sexually Transmitted: Evidence from a Follow-Up Study of Virgins Starting Sexual Activity (Intercourse)." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**: 101-106.

L., L. M. a. L. (2004). "Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **68**(2): 362-372.

Laboratories, A. (2010). Abbott Real Time High Risk HPV. Germany.

Landis J., K. G. (1977). "The measurement of observer agreement for categorical data." Biometrics **33**(1): 159-174.

Leto MG, S. G., Porro AM, Tomimori J. (2011). "Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations." An Bras Dermatol **86**(2): 306-317.

Loghavi S., W. A., Bose S. (2012). "CINtec PLUS Dual Immunostain: A Triage Tool for Cervical Pap Smears With Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance and Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion." Diagnostic Cytopathology.

M. Arbyn, A. A., J. Jordan, G. Ronco, L. von Karsa et al (2010). "European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second Edition—Summary Document." Annals of Oncology **21**: 448–458.

M., S. (2008). "HPV testing and understanding validity: a tough row to hoe." ASC Companion Meeting USCAP.

Madrid-Marina V., T.-P. K., López-Toledo G., García-Carrancá A. (2009). "Advantages and Disadvantages of Current Prophylactic Vaccines Against HPV." Archives of Medical Research **40**(6): 471-477.

Matos A., M. J., Pinto D., Medeiros R. (2005). "The influence of smoking and other cofactors on the time to onset to cervical cancer in a southern European population." European Journal of Cancer Prevention **14**: 485-491.

Medeiros R., P. H., Pinto D., Macedo-Pinto I., Lacerda M, Lopes C. and Cruz E. (2005). **"Characterization of HPV genotype profile in squamous cervical lesions in Portugal, a southern European population at high risk of cervical cancer."** European Journal of Cancer Prevention **14**: 467-471.

Medeiros R., R. D. (2011). "Knowlegde differences between male and female university students about human papillomavirus (HPV) and cervical cancer: Implications for health strategies and vaccination." Vaccine **29**: 153-160.

Moscicki A., H. N., Shiboski S., Powell K. et al (2001). "Risks for Incident Human Papillomavirus Infection and Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Development in Young Females." J American Medical Association **285**(23): 2995-3002.

Munger K., B. A., Edwards K et al. (2004). "Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis." JOURNAL OF VIROLOGY **78**(21).

P., C. (2009). "The evolving definition of carcinogenic human papillomavirus." Infectious Agents and Cancer **4**(7).

P., C. (2009). "Preventing Cervical Cancer: Pediatrician's Role." Indian Pediatrics **46**.

Papillomavirus, S. P. d. (2004). Retrieved Junho 2013, from www.sppv.org.

Petry U., S. D., Bergeron C. et al (2011). "Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology." Gynecologic Oncology **121**: 505-509.

Pista A., O. C., Cunha M., Real O. et al (2011). "Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Women in Portugal." Internation Journal of Gynecological Cancer **21**(6): 1150-1158.

R., H. D. a. W. (2011). "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." Cell **144**(5): 646-674.

R., S. (2009). "HPV vaccination: the promise & problems." Indian J Med Res. **130**(3): 322-326.

Safaeian M., H. R., Hildesheim A., Castle P. et al (2007). "Comparison of the SPF10-LiPA System to the Hybrid Capture 2 Assay for Detection of Carcinogenic Human Papillomavirus Genotypes among 5,683 Young Women in Guanacaste, Costa Rica " Journal of Clinical Microbiology **45**(5): 1447-1454.

Schiffman M, W. N., Castle P, et al. (2011). "Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer." J Natl Cancer Inst. **103**(5): 1-16.

Schiffman M., C. G. a. B. F. (2009). "Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline." Infectious Agents and Cancer **4**(8).

Schmidt D., B. C., Denton K. and Ridder R. (2011). "p16/Ki-67 Dual-Stain Cytology in the Triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou Cytology." Cancer (Cancer Cytopathology) **119**: 158-166.

Sherman M., W. S., Wheeler C., et al. (2003). "Determinants of Human Papillomavirus Load among Women with Histological Cervical Intraepithelial Neoplasia 3: Dominant Impact of Surrounding Low-Grade Lesions." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**: 1038-1044.

Smith J., L. L., Hoots B. et al (2007). "Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update." Int J Cancer **121**: 621-632.

Tjalma, W. A. A. (2006). "Cervical cancer and prevention by vaccination: results from recent trials." Annals of Oncology **17**: 217-223.

Tsoumpou I, A. M., Kyrgiou M, et al. (2009). "p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from uterine cervix: a systematic review and meta-analysis." Cancer Treat Rev **35**(3): 210–220.

Villa L., D. L. (2006). "Methods for detection of HPV infection and its clinical utility." International Journal of Gynecology and Obstetrics **94**(Supplement 1): S71-S80.

Villiers E., F. C., Broker T., Bernard H. and Hausen H. (2004). "Classification of papillomaviruses." Virology **324**: 17-27.

Wentzensen N, B. C., Cas F, et al. (2006). "Triage of Women with ASCUS and LSIL Cytology with p16INK4a scoring." CANCER (Cancer Cytopathology) **111**(1).

Wentzensen N, D. M. (2007). "Biomarkers in cervical cancer screening." Disease Markers: 315-330.

Wentzensen N., G. P., Solomon D., Wheeler C. and Castle P. (2009). "A Study of Amplicor HPV DNA Detection in the ASCUS-LSIL Triage Study." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(5): 1341–1349.

Yang H., Z. R., Schiffman, M. et al (2012). "Clinical and Pathological Heterogeneity of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3." PLoS One **7**(1).